

Daniel de Oliveira Patricio

PROPRIEDADES ANTIVIRAIS DO ÁCIDO ITACÔNICO

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel S. Mansur

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Patricio, Daniel

Propriedades antivirais do ácido itacônico / Daniel
Patricio; orientador, Prof. Dr. Daniel Mansur –
Florianópolis, SC, 2016. 92 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ácido Itacônico. 3. Vírus. I.
Mansur, Daniel. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

“Propriedades Antivirais do Ácido Itacônico”

Por

Daniel de Oliveira Patricio

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (31/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC.

Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho
Coodenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca Examinadora:

Dr. Daniel Santos Mansur (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador

Dr. Aguinaldo Roberto Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dr. Fernando Spiller (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dr. Jamil Assereuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 16 de Dezembro de 2016.

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu pai Leonel Patricio, à minha mãe Tânia de Oliveira Patricio e aos meus irmãos Leanderson e Thaísa pelo total apoio, desde a graduação, nesta minha jornada na área acadêmica. Dedico também à Mayara J. Patricio pelo apoio constante e, principalmente, por sua paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Daniel Mansur, por aceitar me orientar durante a iniciação científica, e por continuar me orientando durante o mestrado e futuramente no doutorado. Agradeço-o por todas as críticas em relação às minhas dificuldades, tendo paciência em me ensinar a aprender com os erros e correr atrás das respostas de maneira independente e profissional. Agradeço também pela amizade adquirida durante estes anos, dentro e fora do laboratório, estimulando ainda mais minha vontade de seguir a carreira acadêmica.

Ao professor André Báfica, por toda ajuda relacionada ao meu trabalho, mas, principalmente por todas as discussões sobre como ser um cientista, com dezenas de dicas pertinentes que certamente não esquecerei.

Ao professor Fernando Spiller por todas as discussões científicas e profissionais, desde a iniciação científica.

À Adara Áurea do Santos por ser minha tutora nos experimentos de biologia molecular, pela paciência em me ajudar nas dificuldades, com discussões e conselhos, e pela ajuda na correção desta dissertação.

À Constanza Espada, por também ser minha tutora nos experimentos de biologia molecular.

À Paula Fernandes do Santos e Renata Cristina Fleith, pela paciência em me aturar desde que entrei no laboratório, pelas discussões e ajudas em experimentos deste trabalho, e pela amizade adquirida nesses anos de convívio.

À Maíra Bicca, por me ajudar nos experimentos finais deste trabalho, e por sempre se esforçar para aumentar o ânimo de todos no laboratório.

Dr. Diogo Kuczera e do Dr. Juliano Bordignon, por me ajudarem nos experimentos com os vírus da Dengue e Zika, e por estarem à disposição para qualquer dúvida relacionada ao trabalho.

À Cristina Lorenzini (minha parceira nos congressos) e Jéssica Copetti, pela ajuda e discussões sobre o trabalho.

Ao demais membros do laboratório de imunobiologia com quem tive o prazer de conhecer, Anelize Baranzeli, Daniel Mendes, Edgar Kozlova, Flávia Cardoso, Francisco de Bem, Lucas Marcarin, Matheus Valente, Murilo Delgobo, Rafael Bezerra, por tornarem o laboratório um lugar agradável de se trabalhar, por todo apoio de cada um, e pelas discussões enriquecedoras nos finais de semana de Immunoweekends.

Aos professores Edmundo Grisard e Mário Steindel, por deixarem as portas de seus laboratórios sempre abertas, nas quais possibilitaram a realização de muitos experimentos deste trabalho através da utilização de equipamentos e reagentes.

Aos docentes da PPG em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação como farmacologista.

Às agências de fomento CNPq e CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de mestrado e do meu trabalho, respectivamente.

RESUMO

A resposta immune através da produção de interferon do tipo I (IFN- α/β) é a primeira linha de defesa contra infecções virais. A ligação em seu receptor (IFNAR1/IFNAR2) está associado com a ativação da via JAK/STAT que estimula a produção de ISGs (*IFN-stimulated genes*). Camundongos deficientes para o gene *Ifnar2* tratados com IFN- β modulam a expressão de genes, independente da via JAK-STAT, sendo o *Irg1* (*Immunoresponsive gene 1*) o gene com maior expressão neste modelo. A IRG1 é uma enzima produzida por macrófagos durante respostas pro-inflamatórias e cataliza a produção de ácido itacônico (IA). Esta enzima também está relacionada com atividades antivirais em células neuronais infectadas por vírus neurotrópicos. No entanto, não está claro se a atividade antiviral do IRG1 está associado com a produção de IA. Para avaliar a atividade antiviral do IA através de sua produção endógena, foi iniciado a construção de células deficientes para o gene *Irg1* e de células com superexpressão deste gene, nas quais estão em andamento. A atividade antiviral do IA também foi abordada através do tratamento exógeno em células infectadas por diferentes vírus. Foi demonstrado que o IA possui atividade antiviral em células infectadas pelo vírus VSVeGFP (*Vesicular stomatitis virus*), observado por citometria de fluxo e por titulação viral. O mecanismo antiviral do IA está associado com a diminuição do pH, pois o tratamento com HCl, no mesmo pH que o IA, também inibiu a infecção por VSVeGFP. Contudo, o IA possui uma atividade antiviral independente de pH acidificado, observado em células infectadas por VSVeGFP resistentes a pH 6.8 ou pelo vírus ZIKV (*Zika virus*). Este trabalho pode contribuir para aumentar o conhecimento em relação à fisiologia das células em respostas à infecções virais e também para geração de novos alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Ácido itacônico. IRG1. Vírus.

ABSTRACT

Immune response through production of type I IFNs (IFN- α/β) is the first defense line against viral infections. Binding to their receptor (IFNAR1/IFNAR2) is associated with JAK/STAT-pathway activation that stimulates production of interferon-stimulated genes (ISGs). *Ifnar2*^{-/-} mice treated with IFN- β modulates gene-expression in a JAK-STAT-independent pathway, with *immunoresponse gene 1* (*Irg1*) being the most upregulated gene in this model. IRG1 is an enzyme produced in macrophages during pro-inflammatory response and catalyses the production of itaconic acid (IA). This enzyme also mediates antiviral effects against different neurotropic viruses in neuronal cells. However, it is unknown if IRG1-antiviral activity is related with IA production. For evaluate the antiviral activity of IA through endogenous production, it was initiated the construction of deficient cells to *Irg1* gene and cells with overexpression of this gene, which are forwarded. The antiviral activity of IA was also approached through exogenous treatment in virus-infected cells. It was demonstrated that IA has antiviral activity in cells infected by VSVeGFP (*Vesicular stomatitis virus*), observed by flow cytometry assay and supernatant titration. The antiviral mechanism of IA is associated with pH decrease, because the HCl treatment, with same pH than IA, also inhibited VSVeGFP infection. Nevertheless, IA also has an antiviral activity in pH independent mechanism, observed in cells infected by pH-resistant VSVeGFP or ZIKV (*Zika virus*) infection. This project might contribute for knowledge regarding cells physiology in viral infection response and also for generation of new therapeutic targets.

Keywords: Itaconic acid. IRG1. Virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de indução de IFN-I via reconhecimento de RNA viral por RIG-I e MDA5.....	14
Figura 2 - Representação esquemática da indução de IFN-I via reconhecimento de DNA viral através de sensores de DNA.....	16
Figura 3 - Representação esquemática das etapas do ciclo viral e os alvos para os ISGs.....	19
Figura 4 - Estrutura química do IA e MA.....	24
Figura 5 - Estratégias de <i>gates</i> para análises de citometria de fluxo.....	27
Figura 6 - Mapa do plasmídeo <i>pX459.V2</i>	31
Figura 7 - Mapa do vetor <i>pGEM-T Easy</i>	35
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo de mutagênese.....	36
Figura 9 - Sequências dos guias para geração de células RAW264.7 deficientes para o gene <i>Irg1</i>	39
Figura 10 - PCR de colônia para identificação de <i>pX459/mIrg1-G1</i> e – <i>G2</i>	40
Figura 11 - Alinhamento dos nucleotídeos de <i>pX459.V2/mIrg1-G1</i> ou <i>G2</i> sequenciadas.....	41
Figura 12 - Reação de qPCR para <i>Irg1</i>	42
Figura 13 - Reação de PCR do DNA derivado de clones de células RAW264.7 transfectados.....	43
Figura 14 - Expressão relativa de <i>Irg1</i> em macrófagos murinos imortalizados.....	44
Figura 15 - PCR de colônia para identificação de <i>pGEM/mIrg1</i>	45
Figura 16 - Alinhamento dos nucleotídeos do <i>pGEM/mIrg1</i> sequenciada.....	46
Figura 17 - Alinhamento dos aminoácidos do <i>pGEM/mIrg1</i> sequenciada.....	47
Figura 18 - PCR de colônia para identificação de <i>pGEM/mIrg1</i> após mutagênese.....	48
Figura 19 - Alinhamento dos nucleotídeos do <i>pGEM/mIrg1(C1)</i> após a reação de mutagênese.....	49
Figura 20 - Citotoxicidade do IA analisada por citometria de fluxo.....	50
Figura 21 - Atividade antiviral do IA analisada por citometria de fluxo.....	51
Figura 22 - Atividade antiviral do IA.....	51
Figura 23 - Inibição de VSVeGFP em diferentes MOIs.....	52

Figura 24 - Atividade antiviral do IA em diferentes MOIs de VSVeGFP.....	53
Figura 25 - Efeito do IA na propagação viral.....	54
Figura 26 - Análise do pH de diferentes concentrações de IA.....	55
Figura 27 - Influência do pH na infecção de VSVeGFP (1).....	56
Figura 28 - Influência do pH na infecção de VSVeGFP (2).....	57
Figura 29 - Geração de VSVeGFP resistente ao pH 6,8.....	58
Figura 30 - Análise de espalhamento viral.....	59
Figura 31 - PCR de colônia para identificação de pGEM/VSVgWT e Res.....	61
Figura 32 - Alinhamento da glicoproteína-G de VSVgWT e VSVgRes.....	62
Figura 33 - Comparação estrutural da glicoproteína-G dos vírus VSVeGFP (WT e Res) em sua forma pós-fusional.....	63
Figura 34 - Localizações das mutações na glicoproteína-G do VSVeGFP resistente ao pH 6,8.....	64
Figura 35 - Células A549 infectadas por VSVgWT e VSVgRes em MOI de 0,05 (1).....	65
Figura 36 - Células A549 infectadas por VSVgWT e VSVgRes em MOI de 0,05 (2).....	67
Figura 37 - Titulação do sobrenadante de células A549 infectadas com VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05.....	68
Figura 38 - Células RAW264.7 infectadas por VSVgWT e VSVgRes em MOI de 0,05.....	68
Figura 39 - Titulação do sobrenadante de células RAW264.7 infectadas por VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05.....	70
Figura 40 - Reação de PCR do DNA derivado de clones de células RAW264.7 transfectados.....	71
Figura 41 - Células A549 infectadas por VACVeGFP em MOI de 0,5 (1).....	72
Figura 42 - Células A549 infectadas por VACVeGFP em MOI de 0,5 (2)	73
Figura 43 - Células A549 infectadas por DENV em MOI de 1, ou ZIKV em MOI de 0,1.....	74
Figura 44 - Desenho esquemático da atividade antiviral do I.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC – Carboximetilcelulose.

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol.

DENV – *Dengue virus*.

FITC – Isotiocianato de fluoresceína.

GFP – Proteína verde fluorescente.

IA – Ácido itacônico.

IFN-I – Interferon do tipo I.

IRG1 – *Immunoresponsive gene 1*.

ISG – *Interferon-stimulated genes*.

HCl – Cloreto de hidrogênio.

MOI – Multiplicidade de infecção.

NaOH – Hidróxido de sódio.

PCR – Reação da cadeia da polimerase.

RMS - *Root Mean Square*.

UFP – Unidade formadora de placa.

VSV – *Vesicular stomatitis virus*.

VSVgRes - *Vesicular stomatitis virus* resistente ao pH.

VSVgWT - *Vesicular stomatitis virus* não resistente ao pH.

VACV – *Vaccinia virus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. RESPOSTA ANTIVIRAL DO SISTEMA IMUNE INATO	14
1.1.1. Reconhecimento viral pelo sistema imune inato	14
1.1.2. Via dos IFNs do tipo I.....	18
1.1.3. ISGs.....	19
1.2. IMUNOMETABOLISMO	21
1.2.1. IRG1	22
1.2.2. Ácido itacônico.....	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. METODOLOGIA.....	25
3.1. CULTURA CELULAR	25
3.2. VÍRUS.....	26
3.2.1. VSVeGFP (<i>Vesicular stomatitis virus</i>)	26
3.2.2. VACVeGFP (<i>Vaccinia virus</i>)	26
3.3. CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)	27
3.4. TITULAÇÃO VIRAL.....	28
3.5. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	29
3.7. MODELAGEM ESTRUTURAL <i>IN SILICO</i> DA GLICOPROTEÍNA G DO VSVEGFP RESISTENTE AO PH 6,8	30
3.8. PRODUÇÃO DE CÉLULAS RAW264.7 DEFICIENTES PARA O GENE <i>IRG1</i>	30
3.8.1. Construção dos guias <i>pX459.V2/mIrg1-G1</i> e <i>G2</i>	31
3.8.2. Transfecção por nucleofecção dos guias <i>mIrg1-G1</i> e <i>G2</i> em células RAW264.7.....	32
3.8.3. Caracterização fenotípica	33
3.8.4. Caracterização genotípica	34
3.9. SUPEREXPRESSÃO DE <i>IRG1</i> EM CÉLULAS A549	35
3.9.1. Construção dos vetores de clonagem <i>pGEM/mIrg1</i>	35
3.9.2. Mutagênese do vetor <i>pGEM/mIrg1</i>	37
4. RESULTADOS	40
4.1. GERAÇÃO DE CÉLULAS RAW264.7 DEFICIENTES PARA O GENE <i>IRG1</i>	40
4.1.1. Construção dos guias <i>mIrg1-G1</i> e <i>G2</i>	40

4.1.2.	Transfecção por nucleofecção dos guias <i>mIrg1-G1</i> e <i>G2</i> em células RAW264.7	42
4.1.3.	Caracterização fenotípica.....	43
4.1.4.	Caracterização genotípica	44
4.2.	SUPEREXPRESSÃO DE <i>IRG1</i> EM CÉLULAS A549	45
4.2.1.	Construção dos vetores.....	45
4.2.2.	Mutagênese.....	48
4.3.	CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ITACÔNICO E SEU EFEITO ANTIVIRAL.....	50
4.4.	INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÁCIDO ITACÔNICO.....	56
4.4.1.	Geração de VSVeGFP resistente ao pH 6,8	58
4.4.2.	Sequenciamento do VSVgRes	61
4.4.3.	Modelagem estrutural das mutações na glicoproteína G de VSVgRes.....	63
4.4.4.	Atividade antiviral do ácido itacônico em VSVgRes.....	65
4.5.	TRATAMENTO COM IA EM CÉLULAS INFECTADAS POR VACVEGFP	73
5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	CONCLUSÕES.....	82
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
	ANEXO	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. RESPOSTA ANTIVIRAL DO SISTEMA IMUNE INATO

1.1.1. Reconhecimento viral pelo sistema imune inato

Para estabelecer uma infecção no hospedeiro mamífero, os patógenos precisam ultrapassar as barreiras físicas, químicas e biológicas. As células epiteliais são um exemplo de barreira física; o muco, presente no trato-gastrointestinal, trato-respiratório e trato genitourinário, liberado pelas células caliciformes, possui peptídeos antimicrobianos e representam um exemplo de barreira química e física pela viscosidade; e a microbiota, com a competição por nutrientes contra microorganismos patogênicos, representam uma barreira biológica. Quando um vírus, por exemplo, consegue ultrapassar estas barreiras e infectar o organismo, células epiteliais e sentinelas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, reconhecem o patógeno invasor e iniciam uma resposta antiviral (MURPHY *et al.*, 2012).

O reconhecimento viral ocorre pela detecção dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) dos vírus através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern-recognition receptors*) presentes nas células. A detecção de ácidos nucleicos virais, como RNA (do inglês *ribonucleic acid*) e DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) é crucial para a resposta inflamatória contra os vírus e este processo é realizado principalmente por sensores citoplasmáticos (WU e CHEN, 2014).

Para o reconhecimento de RNA viral (fita simples - ssRNA ou fita dupla - dsRNA) no citoplasma, as células utilizam uma família de receptores chamadas de receptores semelhantes ao RIG-I (RLR, do inglês *RIG-I like receptors*). Há pelo menos três membros desta família: RIG-I (do inglês *retinoic acid inducible gene-1*), MDA5 (do inglês *melalona differentiation associated gene 5*) e LGP2 (do inglês *laboratory of genetics and physiology 2*) (KANG *et al.*, 2002; YONEYAMA *et al.*, 2004). Estes receptores são semelhantes entre si, porém, o domínio conservado chamado CARD (do inglês *caspase activator and recruitment domains*), responsável por ativar outras proteínas desta via de sinalização, está presente apenas nos receptores RIG-I e MDA5 (MIYOSHI *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2012). O receptor

LGP2 é considerado regulador positivo de RIG-I e MDA5 (SATO *et al.*, 2010).

Através do CARD os RLRs interagem com uma proteína acoplada à mitocôndria chamada MAVS (do inglês *mitochondrial antiviral-signaling protein*). Esta via leva a ativação dos fatores de transcrição IRF3 e IRF7 (do inglês *interferon regulatory factor 3 e 7*) (via IKK ϵ /TBK1) e NF- κ B (do inglês *factor nuclear kappa B*) (via IKK α / β), necessários para transcrição dos interferons (IFNs) do tipo I (IFN-I) (**Figura 1**) (HOFFMANN *et al.*, 2015).

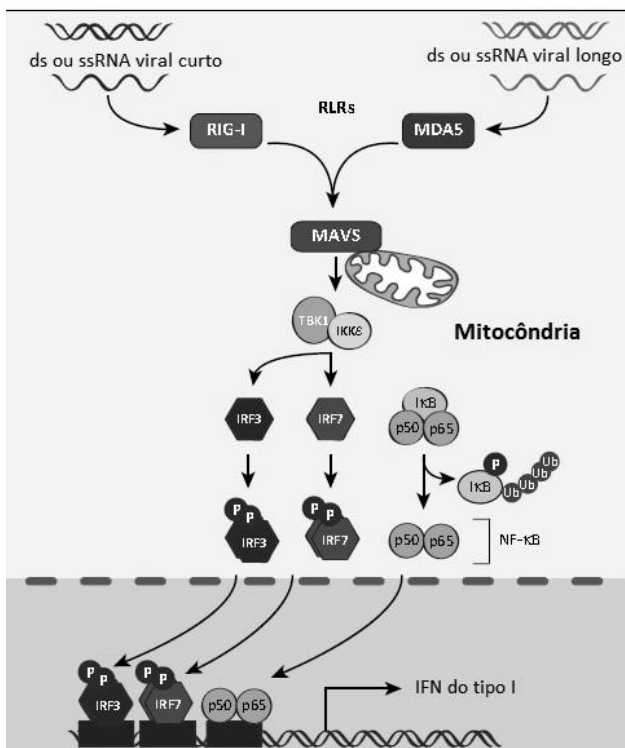


Figura 1. Representação esquemática de indução de IFN-I via reconhecimento de RNA viral por RIG-I e MDA5. Estes sensores iniciam uma via de sinalização que leva a ativação de fatores de transcrição, que por sua vez, promove a transcrição de IFN- α e IFN- β . RLRs (*RIG-I-like receptors*); MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*); IKK (*I κ B kinase*); TBK1 (*TANK-binding kinase 1*); IRF (*interferon regulatory factor*); NF- κ B (*nuclear factor kappa B*); dsRNA (RNA de fita dupla); ssRNA (RNA de fita simples). Imagem adaptada de (HOFFMANN *et al.*, 2015).

Para reconhecimento de DNA viral no citoplasma, as células utilizam diferentes sensores de DNA citosólicos como o DAI (do inglês *DNA-dependent activator of IRFs*) (TAKAOKA *et al.*, 2007), DNA-PK (do inglês *DNA-dependent protein kinase*) (FERGUSON *et al.*, 2012), cGAS (*cyclic-GMP-AMP (cGAMP) synthase*) (SUN *et al.*, 2012), entre outros. A ativação destes sensores também resulta na produção de IFN-I. O sensor de DNA DAI está associado com a ativação da RIP3 (do inglês, *receptor-interacting protein kinase 3*), proteína quinase relacionada com a morte celular programada por necrose (CHO *et al.*, 2009; UPTON *et al.*, 2012). A proteína adaptadora chamada STING (do inglês *stimulator of IFN genes*), localizada no retículo endoplasmático, é essencial para iniciar a resposta imune antiviral, pois recebe o sinal dos sensores de DNA citoplasmáticos, migra para o complexo de Golgi, ativa a proteína TBK1, que por sua vez fosforila IRF3, o qual é o fator de transcrição que estimula a produção de IFN-I (FITZGERALD *et al.*, 2003; ISHIKAWA e BARBER, 2008; ISHIKAWA *et al.*, 2009; TANAKA e CHEN, 2012). Através da proteína RNA polimerase III (RNA-Pol III), DNAs com repetições dos nucleotídeos A (adenina) e T (timina) são reconhecidos e convertidos em RNAs, os quais são detectados pelas RLRs, que iniciam a sinalização desta via, resultando na ativação de IRF3 e NF- κ B e posterior produção de IFN-I e citocinas pró-inflamatórias (CHIU *et al.*, 2009). A **Figura 2** demonstra a via de ativação de IFN-I através dos sensores de DNA.

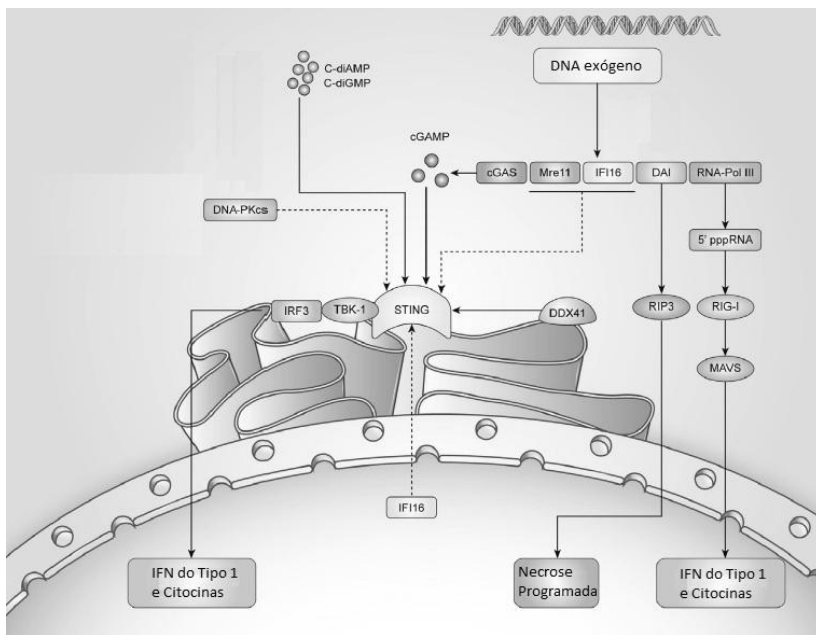


Figura 2. Representação esquemática da indução de IFN-I via reconhecimento de DNA viral através de sensores de DNA. A via canônica por cGAS e cGAMP leva à ativação de STING. Os outros sensores de DNA também ativam STING, porém o exato mecanismo é desconhecido. A transcrição de DNA rico em adenina e timidina pela RNA polimerase III leva à produção de RNA, no qual é reconhecido por RLRs (por exemplo, RIG-I). Ambos os reconhecimentos levam à ativação de NF- κ B e IRF3, que estimulam a transcrição de IFN do tipo I e citocinas. Imagem adaptada de (MANSUR *et al.*, 2014).

Além dos receptores citoplasmáticos citados acima, as células também possuem receptores chamados de TLRs (do inglês *toll-like receptors*) localizados na membrana celular e no citoplasma. Os TLRs que reconhecem o DNA ou o RNA viral estão localizados no citoplasma, em estruturas chamadas de endossomos (O'NEILL *et al.*, 2013). O TLR3 reconhece dsRNA (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001); o TLR7 e TLR8 atuam como dímeros e reconhecem ssRNA (HEMMI *et al.*, 2002; DIEBOLD *et al.*, 2004; HEIL *et al.*, 2004; LUND *et al.*, 2004); e o TLR9 detecta presença de DNA rico em citosina e guanina (sequências CpG) presente também em outros microrganismos, como

bactérias (LUND *et al.*, 2003). A ligação a esses receptores também resulta na produção de IFN-I e de citocinas pró-inflamatórias.

1.1.2. Via dos IFNs do tipo I

Os IFNs do tipo I são os principais componentes do sistema imune para uma resposta antiviral eficiente. É uma família constituída por: 13 subtipos de IFN- α em humanos, IFN- β , além de outros membros menos conhecidos, como IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ e IFN- ζ . Os IFNs mais estudados são IFN- α e IFN- β . Uma vez estimulada, a célula produtora libera o IFN- α/β para o meio extracelular, o qual atuará de forma autócrina e parácrina. Estas proteínas se ligam em seu receptor comum chamado de IFNAR (do inglês *interferon alpha receptor*) que se apresenta na forma heterodimérica IFNAR1 e IFNAR2. O IFNAR precisa estar na forma de heterodímeros para iniciar a sinalização da via clássica do IFN-I (MCNAB *et al.*, 2015). Ambos IFN- α/β têm maior afinidade pelo IFNAR2, e ao realizar a ligação, o IFNAR1 é atraído para dar origem ao complexo IFNAR1/IFNAR2-IFN-I (LAMKEN *et al.*, 2005; WILMES *et al.*, 2015). Quase todas as células podem produzir IFN-I, sendo as maiores produtoras as células dendríticas, que produzem até mil vezes mais IFN- α quando comparado com outras células (SIEGAL *et al.*, 1999).

A via de sinalização do IFN-I é conhecida como JAK-STAT (do inglês *janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT)*). A ligação do IFN- α/β em seu receptor estimula a autofosfolilação de JAK/TYK2 (TYK2, do inglês *tyrosine-protein kinase 2*) presente na porção intracelular do receptor que, por sua vez, transmite o sinal para a proteína STAT1. A STAT1 forma um heterodímero com STAT2, e quando este dímero (STAT1/STAT2) é fosforilado, liga-se à IRF9 formando um complexo chamado ISGF3 (do inglês *IFN-stimulated gene factor 3*). Este complexo atua como um fator de transcrição, estimulando a transcrição de uma família de genes chamados ISGs (do inglês *IFN-stimulated genes*) responsáveis por respostas diretas contra infecções virais (SCHOGGINS *et al.*, 2011; TEIJARO, 2016).

Estudos recentes demonstraram que o IFN- β além de possuir afinidade pelo receptor IFNAR2, também possui maior afinidade pelo IFNAR1 quando comparado com IFN- α . De Weerd e colaboradores (2013) observaram que camundongos deficientes para o receptor IFNAR2 ainda apresentaram fenótipo após a estimulação por IFN- β , o

mesmo não ocorreu com o IFN- α . Interessantemente, a via ativada neste modelo foi independente da via canônica JAK-STAT. Dentre vários genes que aumentaram a expressão, o gene *Irg1* (do inglês *immunoresponsive gene 1*) obteve o maior aumento (DE WEERD *et al.*, 2013).

1.1.3. ISGs

Os ISGs são proteínas produzidas principalmente após a estimulação pelos IFN-I. Já foram descritas centenas de proteínas que constituem esta família. Dentre os diferentes efeitos, há três principais funções dos ISGs. Uma destas funções é a ação antiviral direta, atuando nos diferentes estágios do ciclo viral, como fusão, replicação, formação do envelope viral, brotamento, entre outros. As outras duas principais funções são a regulação positiva e negativa das funções celulares. Sob certas condições, alguns ISGs também podem induzir a morte celular programada por apoptose (SCHNEIDER *et al.*, 2014).

A regulação negativa da via do IFN-I ocorre através de diversos ISGs. Alguns exemplos são as proteínas do tipo SOCS (do inglês, *suppressor of cytokine signaling*), produzidas rapidamente após a ligação do ISGF3 em seu promotor. Estas proteínas agem como falsos substratos, ligando-se na região onde ocorre a fosforilação da proteína alvo. A proteína SOCS1 inibe diretamente o receptor IFNAR e o SOCS2 inibe a proteína JAK. Desta forma, a inibição da fosforilação impede a propagação do sinal e consequentemente, a ativação de STAT1 (HONG e CARMICHAEL, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2014). A ISG USP18 (do inglês, *ubiquitin-specific peptidase 18*) é outro exemplo de regulador negativo e exerce uma dessensibilização da via do IFN-I por tempo mais prolongado. A USP18 se liga no domínio intracelular do receptor IFNAR2 bloqueando a transmissão de sinal para JAK. Esse processo impede a continuação da sinalização da via do IFN-I (MALAKHOVA *et al.*, 2006).

A **Figura 3** mostra diferentes ISGs que bloqueiam infecções virais de forma direta, através da inibição das diferentes etapas do ciclo viral.

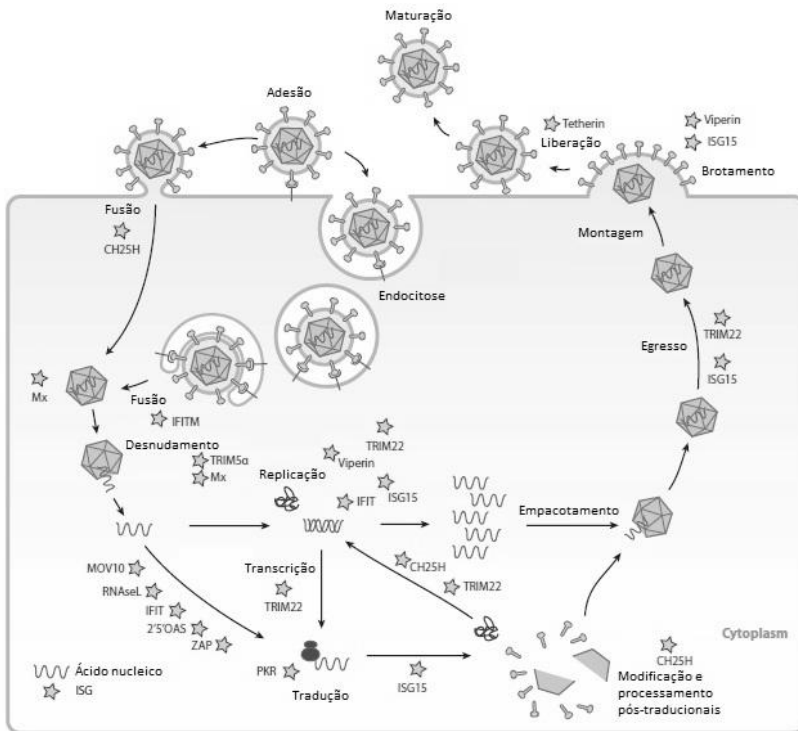


Figura 3. Representação esquemática das etapas do ciclo viral e os alvos para os ISGs. A CH25H (*cholesterol-25-hydroxylase*) inibe a fusão do envelope viral na membrana da célula hospedeira, a maturação de proteínas estruturais e a maturação de enzimas de replicação. IFITM (*IFN-induced transmembrane*) inibe a fusão dos vírus presentes no endossomo. TRIM5 α (*tripartite motif protein 5 α*) inibe o desnudamento de vírus de RNA, por exemplo, HIV-1 (*Human immunodeficiency virus 1*). Mx1 (*myxoma resistance protein 1*) inibe uma variedade de vírus por bloquear a entrada de partículas virais derivadas do endossomo. OAS (2,5-oligoadenylate synthetase), RNase L (*latent ribonuclease L*), PKR (*protein kinase R*), MOV10 (*Moloney leukemia virus 10*) e ZAP (*zinc-finger antiviral protein*) são exemplos de ISGs que degradam RNA viral e/ou bloqueiam a tradução do RNA mensageiro. IFIT (*IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats*) bloqueia a tradução e degradação do RNA viral. TRIM22 inibe a transcrição, replicação e o tráfego de proteínas virais na membrana plasmática. ISG15 pode inibir a tradução, replicação ou o egresso do vírus. Viperin bloqueia a replicação ou o brotamento viral. Tetherin bloqueia partículas virais maduras na membrana plasmática e também inibe a liberação do vírus para o meio extracelular. Imagem adaptada de (SCHNEIDER et al., 2014).

Sabe-se que a produção de IFN-I, além de induzir a transcrição dos ISGs, também influencia na modulação de importantes vias metabólicas, como por exemplo, no aumento da fosforilação oxidativa e na oxidação de ácidos graxos, em um processo chamado de imunometabolismo (WU *et al.*, 2016).

1.2. IMUNOMETABOLISMO

As diferentes vias metabólicas são essenciais para a biossíntese de inúmeros metabólitos responsáveis por manter o equilíbrio nas reservas de energia, que auxiliam a sobrevivência e proliferação das células. Contudo, as células do sistema imune também utilizam estas vias metabólicas para produção de intermediários que influenciam na sua atividade efetora. Dependendo do estímulo de ativação, estas células modificam suas vias metabólicas e geram compostos que normalmente não são produzidos, ou são produzidos em diferentes escalas (O'NEILL *et al.*, 2016).

Os macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) são ativados para um estado pró-inflamatório. Nestas condições há um aumento na via glicolítica. A produção de PKM2 (do inglês, *pyruvate kinase isoenzyme M2*), enzima importante para transformar fosfoenolpiruvato e adenosina difosfato (ADP) em moléculas de piruvato e adenosina trifosfato (ATP) também está aumentada, fornecendo energia para a célula de forma independente de oxigênio (PALSSON-MCDERMOTT *et al.*, 2015).

Sob estímulo de LPS, o metabolismo de macrófagos na via do ciclo do ácido cítrico (TCA, do inglês *tricarboxylic acid cycle*) é bloqueado em dois pontos. O primeiro ponto é o bloqueio na enzima succinato desidrogenase (SDH), resultando no acúmulo de succinato. O aumento de succinato leva à estabilização da proteína HIF-1 α (do inglês, *hypoxia-inducible 1-alpha*) através da inibição do regulador negativo PDH3 (do inglês, *prolyl hydroxylase 3*). A estabilização do HIF-1 α resulta no aumento, por exemplo, do receptor transportador de glicose 1 (GLUT1, do inglês *glucose transporters 1*), aumentando a captação de glicose, e no aumento da produção de IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória (TANNAHILL *et al.*, 2013; JHA *et al.*, 2015). O segundo ponto de bloqueio do TCA é na enzima isocitrato desidrogenase (IDH), responsável pela conversão de isocitrato em α -cetoglutarato. Este bloqueio resulta no acúmulo de citrato, que também possui uma importância na atividade pró-inflamatória da célula, pois é um substrato

para biossíntese de ácidos graxos (necessários para a síntese de prostaglandinas), produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (O'NEILL, 2011; JHA *et al.*, 2015). Como uma forma de compensação, os bloqueios do TCA durante a ativação dos macrófagos induzem o aumento de aspartato e argininosuccinato, que permite a conversão destes metabólitos em malato e que também conectam o TCA com o ciclo da uréia, importante para produção de NO (JHA *et al.*, 2015).

1.2.1. IRG1

A inibição de IDH em macrófagos estimulados por LPS, além de acumular citrato, também leva ao aumento de um ácido dicarboxílico chamado ácido itacônico (IA, do inglês *itaconic acid*), metabólito derivado da descarboxilação de *cis*-aconitato pela enzima IRG1 (MICHELUCCI *et al.*, 2013; JHA *et al.*, 2015).

IRG1 é uma enzima que pertence a família MmgE/PrpD (LOHKAMP *et al.*, 2006) com atividade enzimática semelhante a outra proteína desta família chamada *cis*-aconitato desidrogenase (CAD), encontrada em muitos microorganismos (KANAMASA *et al.*, 2008). Desta forma, o IRG1 humano também é conhecido por ACOD1 (do inglês, *aconitate decarboxylase 1*) (<http://www.genenames.org/>). Neste trabalho, foi chamado de IRG1.

Foi demonstrado que o aumento da expressão de *Irg1* é dependente de estímulos pró-inflamatórios, como por exemplo, em macrófagos murinos estimulados por LPS (LEE *et al.*, 1995; DEGRANDI *et al.*, 2008), assim como em células dendríticas derivadas de medula óssea murina estimuladas por IFN- β (HOSHINO *et al.*, 2002) e em células monocíticas derivadas do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) estimulados por endotoxinas (XIAO *et al.*, 2011; MICHELUCCI *et al.*, 2013). O aumento da expressão de *Irg1* também está relacionada a infecções, como por micobactérias (BASLER *et al.*, 2006), sendo que com *Micobacterium tuberculosis* foi demonstrado que a expressão de *Irg1* é independente dos TLR-2, TLR-4 e de uma série de proteínas relacionadas com a via de sinalização de TLRs, porém é parcialmente dependente de IFNAR e STAT1 (SHI *et al.*, 2005). O aumento da expressão de *Irg1* também foi encontrado em infecções por *Salmonella enterica* e *Toxoplasma gondii* em microglias murinas (LI *et al.*, 2006), em infecções por *Legionella pneumophila* em macrófagos murinos (NAUJOKS *et al.*, 2016) e no

tecido pulmonar de camundongos infectados pelo vírus *influenza A* (PREUSSE *et al.*, 2013).

Cho e colaboradores (2013) infectaram neurônios murinos granulares derivados do cerebelo com diferentes vírus neurotrópicos e observaram um aumento da expressão de *Irg1*, demonstrando que não são apenas as células do sistema imune que produzem esta enzima. Neste mesmo trabalho, foi observado que neurônios murinos corticais derivados do córtex cerebral não expressam *Irg1* após infecção e ao serem transfectadas com a proteína, os títulos virais de WNV (do inglês *West Nile virus*), SLEV (do inglês, *Saint Louis encephalitis virus*) e MHV (do inglês, *Mouse hepatitis virus*) diminuíram. Entretanto, a superexpressão de *Irg1* nas células infectadas por VEEV (do inglês, *Venezuelan equine encephalitis virus*) obteve títulos semelhantes ao grupo de células não transfectadas (CHO *et al.*, 2013).

1.2.2. Ácido itacônico

Em 2011, Sugimoto e colaboradores demonstraram que macrófagos ativados por LPS também produzem IA (SUGIMOTO *et al.*, 2011). Foi observado que o IA regula importantes vias metabólicas, sendo uma delas a inibição da enzima SDH, resultando no acúmulo de succinato (CORDES *et al.*, 2016). O IA também inibe a enzima frutose-2,6-bifostatase, diminuindo a síntese de frutose-2,6-bifosfato, resultando na redução de gordura visceral em ratos (SAKAI *et al.*, 2004).

Michelucci e colaboradores (2013) demonstraram que o IA possui atividade antibacteriana em *Salmonella enterica* e *Mycobacterium tuberculosis* associada com a inibição da isocitrato liase (ICL), enzima importante no ciclo do glioxalato presente em muitas bactérias, plantas, fungos, protozoários, entre outros. Esta via metabólica é utilizada em ambientes pobres em fontes de energia (MICHELUCCI *et al.*, 2013).

Apesar de trabalhos terem demonstrados que a enzima IRG1 é produzida em condições pro-inflamatórias e que está relacionada a uma atividade antiviral, não está claro se o seu mecanismo está associado com a produção de IA. Portanto, a hipótese deste trabalho é: a atividade antiviral do IRG1 está relacionado com a produção de IA.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral do ácido itacônico e elucidar o seu possível mecanismo de ação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Avaliar o impacto da ausência do gene *Irg1* em células infectadas por vírus;

II. Avaliar o impacto da superexpressão do gene *Irg1* em células infectadas por vírus;

III. Analisar o efeito do ácido itacônico em infecções virais.

3. METODOLOGIA

3.1. CULTURA CELULAR

Foram utilizadas as células de linhagem A549 (célula epitelial derivada de pulmão humano - ATCC, CCL-185) e HEK293 (célula epitelial derivada de rim embrionário humano - ATCC, CRL-1573) como modelos de células não produtoras de IA. Como modelo de célula produtora de IA foram utilizadas RAW264.7 (macrófago murino - ATCC, TIB-71) e macrófagos imortalizados derivados de medula óssea murina (doado pelo Dr. Marcelo T. Bozza (Laboratório de Inflamação e Imunidade, UFRJ, RJ, Brasil). Para titulação viral, foi utilizado a célula VERO (célula epitelial derivada de rim de macaco verde africano - ATCC, CCL-81). As células A549, VERO e HEK293 foram mantidas em meio de cultura DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) incompleto (suplementado com 5 % de soro bovino fetal (GIBCO), 2,5 % de HEPES (GIBCO) e 1 % de penicilina e streptomycin (GIBCO)). A célula RAW264.7 foi mantida em meio de cultura DMEM-F12 completo (suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 2,5 % de HEPES, 1 % de penicilina e streptomycin, 1 % de L-glutamina (GIBCO) e 1 % de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, Shanghai, China)). Os macrófagos imortalizados foram mantidos em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO) completo. Todas as células foram incubadas em estufa úmida à 37 °C em 5 % de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações de IA (Sigma-Aldrich), de ácido mesacônico (MA) (Sigma-Aldrich) (análogo ao IA, **Figura 4**), ácido clorídrico (HCl) (VETEC - Sigma-Aldrich) ou hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma-Aldrich). As células foram infectadas por VSVeGFP, VACVeGFP, DENV ou ZIKV. Todas as células foram rotineiramente testadas para contaminação por micoplasma.

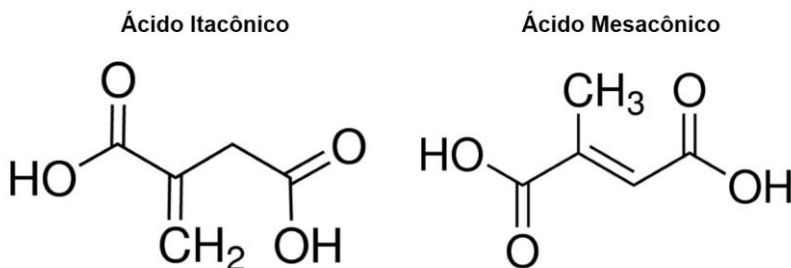


Figura 4. Estrutura química do ácido itacônico e ácido mesacônico.

3.2. VÍRUS

3.2.1. VSVeGFP (*Vesicular stomatitis virus*)

O vírus VSV, contendo uma sequência que codifica para proteína GFP, localizado entre a sequência da glicoproteína-G e da polimerase, denominando VSVeGFP (LAWSON *et al.*, 1995; FREDERICKSEN e WHITT, 1998) foi produzido através da transferência de uma alíquota do vírus na passagem três, em MOI (multiplicidade de infecção) de 0,01, para uma garrafa de cultura de 75 cm² contendo células VERO. Após 24 h de incubação em estufa úmida à 37 °C com 5 % de CO₂, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado em 500 x g por 5 min à 4 °C. O sobrenadante contendo o vírus foi alíquotado e armazenado em freezer à -80 °C. O título do vírus, passagem quatro, foi de 1,5 x10⁸ unidade formadora de placa (UFP) por mL, determinado pela técnica de titulação. O vírus foi doado pelo Dr. João Trindade Marques (Laboratório de Neurobioquímica de RNA de Interferência, UFMG, MG, Brasil).

3.2.2. VACVeGFP (*Vaccinia virus*)

A produção do vírus VACV, contendo uma sequência que codifica para proteína GFP, denominando VACVeGFP (HUSAIN e MOSS, 2001), passagem quatro, foi realizada através da infecção de células VERO pelo vírus na passagem três (MOI de 0,1) em uma garrafa de cultura de 150 cm² por 48 h em estufa úmida à 37 °C com 5 % de CO₂. As células, juntamente com o sobrenadante, foram removidas da garrafa por raspagem com o auxílio de um *cell scraper* (BD, New Jersey, EUA) e transferidas para um tubo de 50 mL. Em seguida o tubo

foi centrifugado em 500 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células, contendo o vírus intracelular ou aderido na membrana, foram suspensas em 1 ml de meio DMEM-F12, aliqüotados e armazenados em freezer à -80 °C. Para a realização dos experimentos, o vírus passa por banho de ultrassom (Unique, São Paulo, Brasil) por 15 s para romper a membrana das células e homogeneizar o VACVeGFP. O título do vírus, passagem 4, foi de $2,4 \times 10^7$ UFP/mL. O vírus foi doado pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, Bethesda, Maryland, EUA).

3.3. CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)

Em placas de 12 poços, diferentes células foram infectadas por vírus que expressam GFP e foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, com auxílio de tripsina (Lonza), na qual, foram centrifugadas em 460 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado para titulação viral. As células foram suspensas em 500 µL de tampão fosfato (PBS) 1X e novamente centrifugadas em 460 x g por 10 min. As células foram novamente suspensas em 200 µL de PBS e deixadas em gelo até a aquisição das amostras no equipamento FACSVerse (BD). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software FlowJo-VX. Para avaliar a morte celular foi adicionado iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*) (BD), um intercalante de DNA que atravessa a membrana de células danificadas.

Foi criada uma estratégia de *gates* na análise das amostras adquiridas pelo citômetro de fluxo. Como ilustrado na **Figura 5**, foram utilizadas células sem adição de moléculas fluorescentes para determinação da referência negativa. Na **Figura 5A** foram retiradas as células acima do limite de detecção para o parâmetro *tamanho* (FSC, do inglês *Forward Scatter Channel*) e para o parâmetro *complexidade* (SSC, do inglês *Side Scatter Channel*). A seguir (**Figura 5B**), foram retiradas as células com autofluorescência (células falso positivas), utilizando um detector que não detecta as moléculas fluorescentes adicionadas no experimento. Na **Figura 5C** foi determinado o *gate* a ser utilizado para identificar a positividade das amostras; a amostra utilizada (sem marcação) demonstra a porcentagem de células falso positivas que será descontado das amostras marcadas. Esta estratégia foi utilizada em todos os experimentos de citometria deste trabalho.

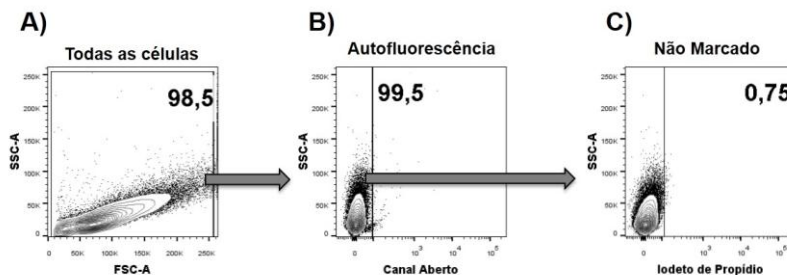


Figura 5. Estratégias de *gates* para análises de citometria de fluxo. A) Configuração dos *gates* a partir das células totais. B) Eliminação de células autofluorescentes. C) *Gate* que representa células positivas para iodeto de propídio configurado a partir da amostra de células não marcadas. SSC-A: Dispersão lateral de luz (complexidade). FSC-A: Dispersão frontal de luz (tamanho). Canal aberto: APC, 783/56 nm.

3.4. TITULAÇÃO VIRAL

O sobrenadante das células infectadas por vírus foi coletado e mantido em temperatura de -80°C até a realização do procedimento de titulação. Após o descongelamento, foi feita uma diluição seriada das amostras em meio de cultura e transferidas para placas de 24 poços contendo células VERO em aproximadamente 80 % de confluência. A placa contendo as amostras diluídas do vírus foi incubada por 90 min em estufa úmida à 37°C com 5 % de CO_2 e em seguida foi lavado com PBS para remoção de remanescentes virais que não infectaram as células. Foi adicionado meio DMEM-F12 contendo 1 % de soro fetal bovino e 1,6 % de carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-aldrich) com objetivo de obter um meio com maior viscosidade para que os vírus liberados infectem as células adjacentes. As placas foram novamente incubadas em estufa úmida à 37°C com 5 % de CO_2 por tempos que variaram de acordo com o tipo viral a ser titulado, na qual foi observada a formação de UFPs. Após o tempo de incubação foi adicionado 500 μL de paraformaldeído (Sigma-aldrich) 3 % por poço e incubado por 1 h em temperatura ambiente para fixação das amostras. A placa foi lavada 3 vezes com água corrente em fluxo baixo e posteriormente foi adicionado uma solução de cristal violeta 1 % (Sigma-aldrich) com volume suficiente para cobrir o fundo do poço. A placa foi incubada por 30 min e posteriormente lavada com água corrente em fluxo baixo. As UFPs foram quantificadas para estimar o título viral.

3.5. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A placa com células infectadas por vírus contendo o gene que codifica GFP foi observada por microscópio de fluorescência (Olympus BX40) acoplado com uma câmera (Olympus DP72) localizada no Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC). Em alguns ensaios foi adicionado o marcador de ácidos nucleicos DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate*) na concentração de 3 μ M para visualização do núcleo das células que foram incubados por 20 min à temperatura ambiente sob proteção de luz. As imagens foram adquiridas pelo *software Olympus Cell P*.

3.6. SEQUENCIAMENTO DA GLICOPROTEÍNA G DE VSVeGFP RESISTENTE AO PH 6,8

Uma alíquota do vírus foi utilizada para extração de RNA viral através do *QIAamp Viral Mini kit* (QIAGEN). O RNA extraído foi convertido para DNA complementar (cDNA) utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo) com iniciador *GFP Rev* (**Tabela 9 - anexo**). Com o cDNA, foi realizado uma PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os iniciadores *VSIV-1/5 Fwd* e *GFP Rev* (**Tabela 9 - anexo**). O produto de PCR foi utilizado para inserção no vetor de clonagem *pGEM*, através de uma reação de ligação utilizando a enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen) na proporção 1:3 (vetor:inserto). O vetor ligado foi inserido em bactérias *Escherichia coli* TOP10⁺ quimio-competentes e plaqueado em meio LB (*Luria Broth*) com ágar e suplementado com o antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) para selecionar apenas as bactérias que receberam o vetor *pGEM* ou *pGEM* ligado. Após cerca de 16 h de incubação à 37 °C, houve crescimento de colônias e algumas foram selecionadas. Foi realizado um PCR de colônia nas colônias selecionadas utilizando os iniciadores *T7 Fwd* e *M13 Rev* (**Tabela 9 - anexo**). O produto do PCR foi utilizado em uma eletroforese em gel de agarose de 1 % para confirmação da colônia positiva para o *pGEM* ligado. As colônias positivas foram expandidas em meio LB líquido, e o DNA plasmidial foi purificado através do *PureYield Plasmid Miniprep System kit* (Promega). O DNA purificado foi dosado e posteriormente foi enviado 100 ng de cada amostra para sequenciamento, pelo método de Sanger, para a empresa MyLeus Biotecnologia (MG, Brasil). Os iniciadores utilizados para o

sequenciamento foram: *T7 Fwd*, *VSIV-1/5 Fwd*, *VSIV-2/5 Fwd*, *VSIV-3/5 Fwd*, *VSIV-4/5 Fwd*, *VSIV-5/5 Fwd* e *GFP Rev* (**Tabela 9 – anexo**).

3.7. MODELAGEM ESTRUTURAL *IN SILICO* DA GLICOPROTEÍNA G DO VSVeGFP RESISTENTE AO PH 6,8

As sequências da glicoproteína G do vírus VSV (selvagem (WT) ou resistente ao pH (Res)) em vetores de expressão foram sequenciadas e traduzidas para aminoácidos, da qual foi realizado um alinhamento com sequências controle derivados de banco de dados *UniProt* (P0C2X0) e *Protein databank* (5I2M), através do programa *t-coffee expresso* (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:expresso>) e visualizado com programa *ESPrpt 3.0* (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>). Utilizando o programa *Modeller* (<http://salilab.org/modeller/>) foram gerados 10 modelos estruturais da glicoproteína G das amostras, sem correção dos átomos, e utilizando o controle 5I2M como molde. O melhor molde de cada amostra foi filtrado baseado no ângulo de torção dos resíduos de aminoácidos. Para isso, foram utilizados o *Q-score* presente no programa *Modeller* e o *ramachandran* pelo programa *Rampage* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). A visualização das estruturas alinhadas foi realizada através do *software Pymol*, na qual foi possível calcular a diferença das estruturas pela área medida em angstroms (RMS, do inglês *Root Mean Square*).

3.8. PRODUÇÃO DE CÉLULAS RAW264.7 DEFICIENTES PARA O GENE *IRG1*

Para produção de células RAW264.7 deficientes para o gene que codifica a proteína IRG1 foi utilizado a técnica de *CRISPR/Cas9* (RAN *et al.*, 2013).

3.8.1. Construção dos guias *pX459.V2/mIrg1-G1 e G2*

A construção dos guias para o gene *Irg1* foi auxiliado pelo software DNA2.0 (<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>) na escolha de sequências com maior *score* no gene. Em seguida, as sequências escolhidas (**Tabela 9 - anexo**) foram alinhadas com o banco de dados por BLAST (*blastn suite*, NCBI - National Center for Biotechnology Information) para exclusão da possibilidade de ligação em outras regiões do genoma. Com os guias corretos, foi adicionado a sequência para reconhecimento da enzima de restrição *BbsI* (NEB, New England BioLabs, UK) necessárias para ligação no vetor de expressão *pX459.V2* (**Figura 6**). As sequências dos guias foram sintetizadas pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os guias foram fosforilados utilizando a enzima *T4 PNK* (NEB). Foi utilizado 5 µg do vetor *pX459.V2* para digestão com a enzima *BbsI* (NEB) e o tampão *1X NEBuffer 2.1* (NEB). Os guias fosforilados foram inseridos no vetor *pX459.V2* utilizando a enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen). Os vetores *pX459.V2/Irg1-G1* e *G2* foram inseridos em bactérias *E. coli TOP10f'* quimiocompetentes e plaqueados em meio LB-ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL). Após cerca de 16 h de incubação à 37 °C, foram selecionadas algumas colônias para confirmação da presença dos vetores por PCR de colônia, utilizando os iniciadores *Irg1-G1 Fwd* e *CAG Rev* (**Tabela 9 - anexo**). O produto da PCR foi utilizado em uma eletroforese em gel de agarose de 1 % para confirmação da colônia positiva para *pX459.V2* contendo os guias. As colônias positivas foram expandidas em meio LB líquido e o DNA plasmidial foi purificado através do *PureYield Plasmid Miniprep System kit* (Promega). O DNA purificado foi dosado e posteriormente enviado 100 ng de cada amostra para sequenciamento, pelo método de Sanger, para empresa Myleus Biotecnologia. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram o *pBR322 Fwd* e *CAG Rev* (**Tabela 9 - anexo**).

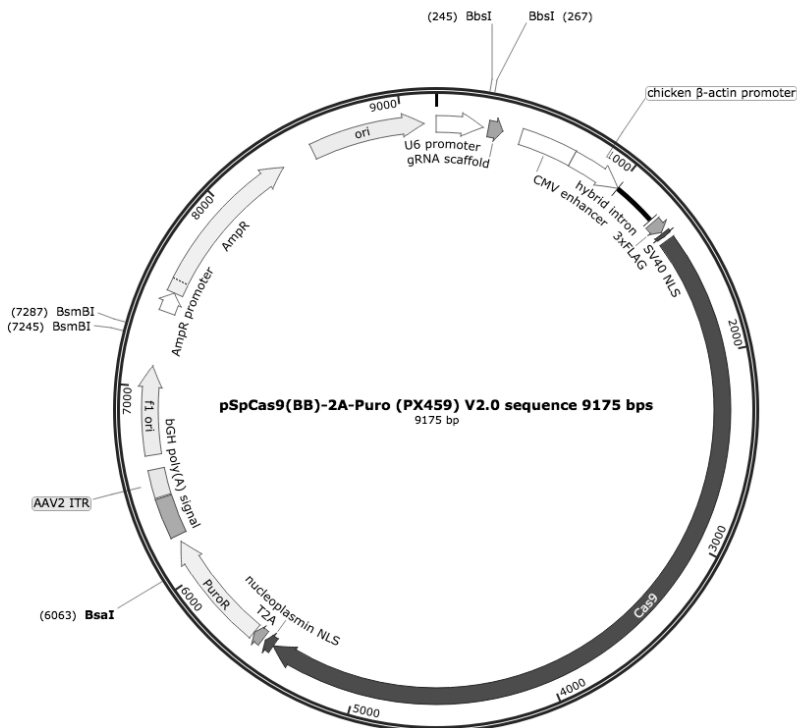


Figura 6. Mapa do plasmídeo *pX459.V2*. Vektor de expressão em eucariotos (promotor U6). Possui gene de resistência para os antibióticos ampicilina e puromicina. Presença do gene que codifica a *Cas9* e o *scaffold gRNA*.

3.8.2. Transfecção por nucleofecção dos guias *mIrg1-G1* e *G2* em células RAW264.7

Em um microtudo de 0,6 mL foram adicionados os seguintes reagentes (**Tabela 1**):

Tabela 1. Descrição dos reagentes e concentrações utilizadas na reação de nucleofecção.

Reagentes	Quantidade
pX459.V2/Irg1-G1	500 ng
pX459.V2/Irg1-G2	500 ng
Água ultrapura (Thermo)	qsp para 20 µL
Tampão BSF 3X	10 µL
Tampão BSF 1X	70 µL

As células RAW264.7 (2×10^6 células) foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugados em 90 x g por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram suspensas com a solução de BSF contendo os guias. As células foram transferidas para cubetas de eletroporação para realizar a reação de nucleofecção no programa D-032 do equipamento *Nucleofector 2b Device* (Lonza), localizado no Laboratório de Protozoologia da UFSC. Foi adicionado 500 µL de meio DMEM-F12 completo nas cubetas e o conteúdo foi transferido para placas de cultura de 6 poços, no qual foi adicionado mais 900 µL de DMEM-F12 completo. Após 24 h, foi adicionado 2 µg/mL de puomicina para seleção dos clones contendo os guias inseridos. O meio com o antibiótico foi trocado cada 48 h. Após a proliferação das células remanescentes, foi realizada uma diluição limitante calculando 0,5 células por poço em uma placa de 96 poços. Os poços com apenas uma célula foram selecionadas e após atingirem 100 % de confluência, foram realizadas caracterizações fenotípicas e genotípicas da mutação do gene *Irg1*.

3.8.3. Caracterização fenotípica

Os clones foram estimulados com 100 ng/mL de LPS por 6 h. O RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (Thermo), seguindo o protocolo do fabricante. Para síntese do cDNA, foi utilizado 1 µg do RNA e o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo), seguindo o protocolo do fabricante. Para a reação do qPCR foi utilizado o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo) seguindo o protocolo do fabricante com volume final da reação de 10 µL. Os iniciadores utilizados foram *mIrg1 (qPCR) Fwd/Rev* e *mGAPDH Fwd/Rev* (**Tabela 9 – anexo**). As amostras foram comparadas com o controle endógeno *GAPDH*. A expressão relativa dos genes foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $-\Delta\Delta Ct = -[(Ct \text{ gene alvo} - Ct$

endógeno) amostra analisada] - [(Ct gene alvo – Ct endógeno) amostra normalizadora. As alterações na expressão de RNAm foram apresentadas como expressão relativa ao controle sem estímulo. Os valores foram expressos como a média de duplicata técnica.

3.8.4. Caracterização genotípica

Para caracterização genotípica foi extraído o DNA total dos clones selecionados. As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 460 x g por 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 200 µL de solução de lise (Proteinase K 200 µg/mL; NaOH 0,2 N; SDS 1 % m/v) e incubadas à 56 °C por 16 h. Foi adicionado 50 µL de solução de neutralização (acetato de potássio 5 M) em cada amostra e foram centrifugadas a 2000 x g por 3 min à 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, contendo 200 µL de isopropanol e foi novamente centrifugado a 2000 x g por 15 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram suspensas com 500 µL de etanol 70 % e novamente centrifugados a 2000 x g por 15 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram deixadas com a tampa aberta para secagem e foram suspensas em 20 µL de água ultrapura (Thermo).

A identificação da modificação gênica foi realizado pelo método de PCR, utilizando os iniciadores *mIrg1* (*qPCR*) *Fwd/Rev* (**Tabela 9 - anexo**) e a enzima *GoTaq DNA polimerase* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Segue na **Tabela 2** a descrição das reações de PCR, e na **Tabela 3** as temperaturas utilizadas.

Tabela 2. Descrição dos reagentes e concentrações utilizados na reação de PCR

Reagentes	Volume por amostra (µL)	Concentração final
5X <i>GoTaq Buffer</i>	2	1X
2 mM dNTP	1	0,2 mM
10 µM Iniciador For	1	1 µM
10 µM Iniciador Rev	1	1 µM
5 U/µL <i>GoTaq Polimerase</i>	0,25	1,25 U
DNA	1	50 ng
Água ultrapura (qsp para 10 µL)	3,75	-

Tabela 3. Temperaturas da reação de PCR.

Procedimento	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	45 s	35
Anelamento	58 °C	30 s	
Extensão	72 °C	2 min	
Extensão final	72 °C	5 min	1

O produto da amplificação foi resolvido em gel de bisliacrilamida 10 % em tampão TBE (tris-borato pH 8,0). O gel foi corado com brometo de etídio.

3.9. SUPEREXPRESSÃO DE *IRG1* EM CÉLULAS A549

3.9.1. Construção dos vetores de clonagem *pGEM/mIrg1*

Macrófagos murinos imortalizados (MφI) foram estimulados com LPS por 6 horas. O RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol (Thermo), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo) e o iniciador *Irg1 (NotI) Rev* (**Tabela 9 - anexo**), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, o cDNA sintetizado foi utilizado para realizar uma PCR utilizando a enzima *Platinum PCR SuperMix* (Thermo) (**Tabelas 4 e 5**) e os iniciadores *Irg1 (NheI) Fwd* e *Irg1 (NotI) Rev* (**Tabela 9 - anexo**). O produto de PCR foi ligado no vetor *pGEM-T Easy* (Promega) (**Figura 7**), utilizando a enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen). O produto foi transformado em bactérias termocompetentes *E. coli* cepa *Top10^f*.

Tabela 4. Descrição dos reagentes e concentrações utilizadas na reação de *PCR SuperMix*

Reagentes	Volume por amostra (µL)	Concentração final
<i>Platinum PCR SuperMix</i>	45	1 X
10 µM Iniciador For	1	1 µM
10 µM Iniciador Rev	1	1 µM
Água ultrapura (qsp para 10 µL)	3,75	-

Tabela 5. Temperaturas da reação de PCR *SuperMix*.

Procedimento	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	2 min	1
Desnaturação	94 °C	30 s	35
Anelamento	55 °C	30 s	
Extensão	72 °C	2 min	
Extensão final	72 °C	5 min	1

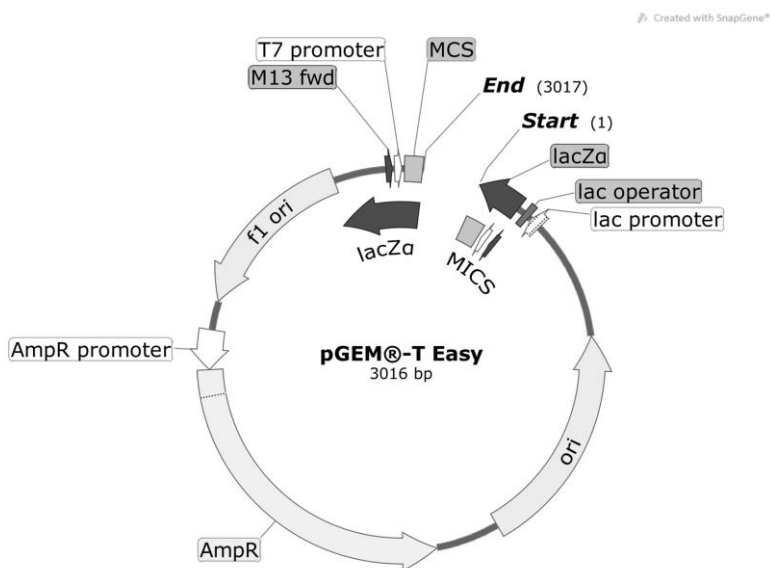


Figura 7. Mapa do vetor *pGEM-T Easy*. Representação gráfica indicando os sítios de restrição (Promega). Região de início da transcrição de T7 (1); região de múltipla clonagem (10-113); região promotora para SP6 (124-143); região de início da transcrição de SP6 (126); região de ligação da sequência reversa do iniciador M13 (161-177); início do codon lacZ (165); região codificante para β-lactamase (1322-2182); região f1 (2365-2820); sequência do operon lac (2821-2981, 185-201); região de ligação da sequência *Forward* do iniciador M13 (2941-2957) e a região promotora para T7 (2984).

A confirmação da clonagem foi realizada por PCR de colônia, utilizando os iniciadores *Irg1-NheI For* e *Irg1-NotI Rev* (ver **Tabela 9 - anexo**) e a enzima *GoTaq DNA polimerase* (Promega) (ver **Tabela 2 e Tabela 3**). A colônia que incorporou o vetor corretamente foi expandida

e o plasmídeo foi purificado pelo *PureYield Plasmid Miniprep System kit* (Promega), obedecendo o protocolo do fabricante. O produto purificado foi sequenciado, através do método de Sanger, pela empresa Mylueus Biotecnologia, utilizando os iniciadores *T7 Fwd*, *mIrg1 (qPCR) Fwd*, *mIrg1 (3/5) Fwd*, *mIrg1 (4/5) Fwd* e *M13 Rev* (**Tabela 9 - anexo**).

3.9.2. Mutagênese do vetor *pGEM/mIrg1*

Duas mutações no vetor *pGEM/mIrg1* foram realizadas através do *GeneArt® Site-Directed Mutagenesis PLUS kit* (Thermo) (**Figura 8**). Para isso, foram desenhados os iniciadores *pGEM/mIrg1-Mut1 Fwd/Rev*, e *mIrg1-Mut2 For/Rev* (**Tabela 9 - anexo**), obedecendo as recomendações do fabricante. Para a reação de metilação e mutagênese, foram preparadas misturas (*Mix*) (**Tabela 6**) dos iniciadores desenhados para reação.

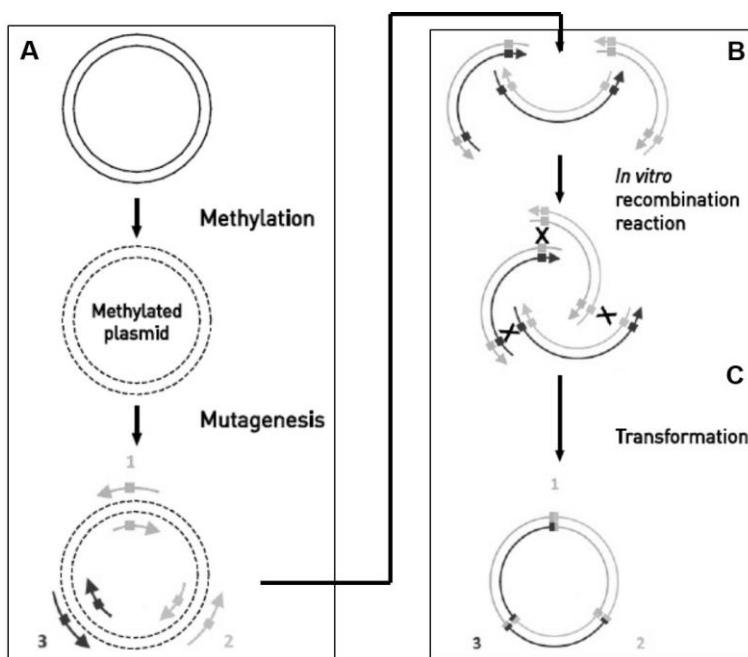


Figura 8. Representação esquemática do protocolo de mutagênese. (A) Metilação do DNA plasmidial e amplificação do plasmídeo em uma reação de mutagênese com até três alvos de mutações. (B) Reação de recombinação *in vitro*. (C) Transfomação de bactérias competentes *E. coli DH5αTM-T1^R*

utilizando as amostras, na qual digere o DNA metilado e conserva o DNA mutado não metilado. Imagem adaptada do protocolo *GeneArt® Site-Directed Mutagenesis PLUS kit*.

Tabela 6. Preparo das misturas (*Mix*) para reação de metilação e mutagênese.

<i>Mix 1</i>	<i>pGEM/mIrg1-Mut1 Fwd</i> (100 µM)	2 µL
	<i>pGEM/mIrg1-Mut2 Rev</i> (100 µM)	2 µL
	Água ultrapura	16 µL
<i>Mix 2</i>	<i>pGEM/mIrg1-Mut2 Fwd</i> (100 µM)	2 µL
	<i>pGEM/mIrg1-Mut1 Rev</i> (100 µM)	2 µL
	Água ultrapura	16 µL

Foram utilizados 25 ng do vetor *pGEM/mIrg1* para cada *Mix* de reação, seguindo as informações presentes na **Tabela 7**.

Tabela 7. Descrição dos reagentes e concentrações utilizadas na reação de metilação e mutagênese.

Reagentes	Volume por amostra (µL)	Concentração final
10X <i>pfx Amplification Buffer</i>	4	1X
10 mM dNTP	1,2	0,3 mM
50 mM MgSO ₄	0,8	1 mM
10X <i>Enhancer</i>	4	1X
DNA <i>Methylase</i> (4 U/µL)	1,2	4,8 U
25X SAM	1,6	1X
<i>Platinum pfx DNA Polimerase</i>	0,4	1 U
DNA (vetor)	x	50 ng
Água ultrapura (qsp para 38 µL)	x	-

Foi adicionado 1 µL de cada *Mix* de iniciadores em tubos de 0,6 mL separados. Em seguida, foi adicionado 19 µL da mistura (**Tabela 7**) em cada tubo. A reação de metilação e mutagênese foi realizada seguindo os parâmetros da **Tabela 8**.

Tabela 8. Temperaturas da reação de PCR para metilação e mutagênese.

Temperatura	Duração	Número de ciclos
37 °C	20 minutos	1
94 °C	2 minutos	
94 °C	20 segundos	18
60 °C	30 segundos	
68 °C	2,5 minutos	
68 °C	5 minutos	1

Para confirmação da amplificação, foi realizado uma eletroforese utilizando 10 µL de cada reação em gel de agarose 1 % e corado com brometo de etídeo. O produto de reação da mutagênese foi utilizado para reação de recombinação, na qual foram adicionados 2 µL de cada reação, 6 µL de água ultra pura e 10 µL de *GeneArt® 2X Enzyme Mix*. A mistura foi incubada por 15 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida após adição de 1 µL de EDTA 0,5 M. Do produto da reação de recombinação foram utilizados 3 µL para transformação em bactérias *E. coli* cepa *DH5α-T1*. Após 16 h de incubação à 37 °C das bactérias em placas com meio sólido, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, foi realizado uma PCR de colônia para confirmação da presença do vetor nas colônias selecionadas. As colônias que incorporaram o vetor corretamente foram expandidas e os plasmídeos foram purificados pelo *PureYield Plasmid Miniprep System kit* (Promega), obedecendo o protocolo do fabricante. A mutação do produto purificado foi confirmada pelo sequenciamento realizado pela empresa Myleus Biotecnologia, utilizando o método de Sanger, com os iniciadores *T7 Fwd*, *mIrg1 (qPCR) Fwd*, *mIrg1 (3/5) Fwd*, *mIrg1 (4/5) Fwd* e *M13 Rev* (**Tabela 9 - anexo**).

horas de incubação, foram selecionadas cinco colônias de cada vetor para confirmação da amplificação dos guias por PCR de colônia (**Figura 10**). Foi observado que todas as colônias selecionadas eram positivas para os vetores, amplificando no tamanho esperado de 482 pb.

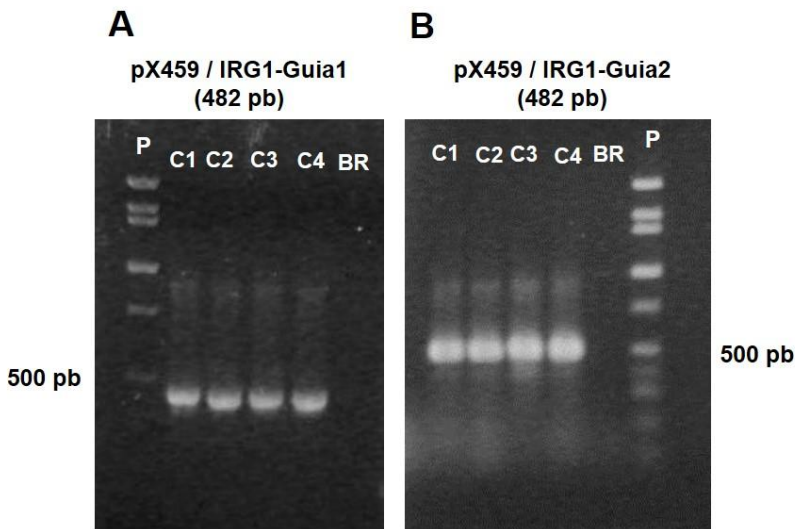


Figura 10. PCR de colônia para identificação de *pX459/mIRG1-G1* e *-G2*. Eletroforese em gel de agarose 1 % dos vetores *pX459/mIRG1-G1* e *G2*. **A)** *pX459/mIRG1-G1*. **B)** *pX459/mIRG1-G2*. P: Marcador de peso molecular 100 pb *Low Scale DNA Ladder*. C: colônia. BR: Branco. Iniciadores utilizados: *mIRG1-G1* (ou *-G2*) *Fwd* e *CAG Rev*.

As colônias C2 de cada guia foram selecionadas para expansão em meio LB líquido e os DNAs plasmidiais foram purificados. Os DNAs purificados foram dosados e posteriormente enviados para sequenciamento (**Figura 11**). As amostras foram alinhadas (EDGAR, 2004) e o resultado mostra que os guias estão de acordo com o esperado. As regiões não alinhadas se referem a região de restrição da enzima *BbsI*, presente no vetor *pX459* e que foi utilizada para ligação do inserto.

```

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

pX459/mIRG1-G1_teórico      TGGAAAGGACGAAACACCGGGTCTTCACCTGTCTCACAGCTCTATCGGGAGAAGACCTG
pX459/mIRG1-G1_sequenciado  TGGAAAGGACGAAACACCG-----ACCTGTCTCACAGCTCTATCGG-----G
*****

pX459/mIRG1-G1_teórico      TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
pX459/mIRG1-G1_sequenciado  TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
*****

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

pX459/mIRG1-G2_teórico      TGGAAAGGACGAAACACCGGGTCTTCCTGCCACCCACCTTCTGGGGCGAGAAGACCTG
pX459/mIRG1-G2_sequenciado  TGGAAAGGACGAAACACCG-----CCTGCCACCCACCTTCTGGGGC-----G
*****

pX459/mIRG1-G2_teórico      TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
pX459/mIRG1-G2_sequenciado  TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTG
*****

```

Figura 11. Alinhamento dos nucleotídeos de *pX459.V2/mIrg1-G1* ou *G2* sequenciadas. O alinhamento foi realizado utilizando a sequência teórica do gene de referência *mIrg1* (*Acod – GenBank*) ligada ao vetor *pX459.V2*.

De acordo com os resultados, os guias estão prontos para transfecção nas células RAW264.7.

4.1.2. Transfecção por nucleofecção dos guias *mIrg1-G1* e *G2* em células RAW264.7

As células RAW264.7 foram transfectadas com os guias construídos através da reação de nucleofecção. Após a transfecção, as células foram incubadas por 24 h para recuperação. Em seguida, foi adicionado 2 µg/mL de puomicina para seleção das células transfectadas, que foram novamente incubadas por 48 h. Posteriormente, o meio foi trocado por outro sem antibiótico para proliferação das células remanescentes. Para seleção clonal, foi realizada uma diluição limitante, calculando 0,5 células por poço em uma placa de 96 poços, na qual foram observados 11 poços contendo apenas uma célula. Após a proliferação das células, até atingirem 100 % de confluência, foram realizadas as caracterizações fenotípicas e genotípicas para avaliar se as células estão deficientes para o gene *Irg1*.

4.1.3. Caracterização fenotípica

As células foram estimuladas com 100 ng/mL de LPS por 6 h. O RNA foi extraído e utilizado para síntese de cDNA. O cDNA foi utilizado na reação de qPCR para o gene *Irg1* e para o controle endógeno *GAPDH*. Como controle positivo foi utilizado a célula RAW264.7-WT (sem transfecção) tratada com LPS e como controle negativo foi utilizado a célula RAW264.7-WT sem estímulo (**Figura 12**). Observou-se que todas as amostras transfectadas expressaram *Irg1*. A **Figura 12B** mostra a curva de dissociação do *Irg1*, na qual todas as amostras obtiveram a dissociação na mesma temperatura, indicando que os *amplicons* estão no mesmo tamanho.

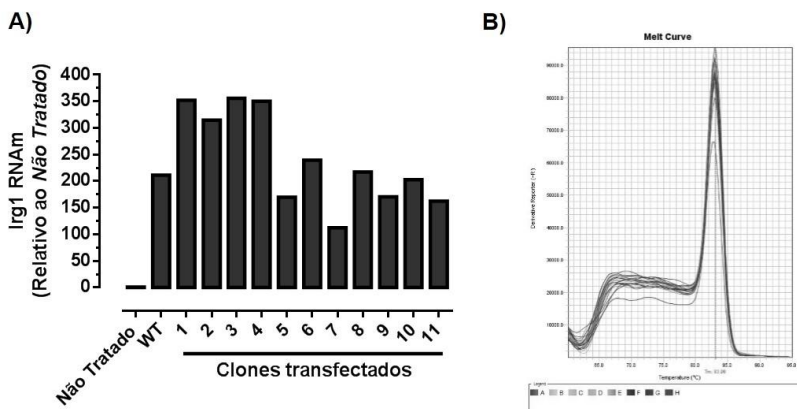


Figura 12. Reação de qPCR para *Irg1*. A) Expressão relativa de *Irg1* em células RAW264.7 estimuladas com 100 ng/mL de LPS por 6 horas. Controle: Sem estímulo; Controle endógeno: *GAPDH*. B) Curva de dissociação de *Irg1*.

Estes resultados sugerem que as células transfectadas continuam expressando o gene *Irg1*. No entanto, o clone 7 obteve menor expressão de *Irg1* comparado com o controle (WT) e foi utilizado para a avaliação genotípica juntamente com o clone 1, que obteve o resultado oposto.

4.1.4. Caracterização genotípica

Os clones 1 e 7 das células RAW264.7 foram utilizados para caracterização genotípica, juntamente com o controle WT. O DNA total das células foi extraído e o gene *Irg1* editado foi confirmado pelo método de PCR. O produto de PCR foi resolvido em gel de bisacrilamida 10 % e corado em brometo de etídeo (**Figura 13**). Foram observadas amplificações em dois tamanhos distintos em ambas as amostras. Uma das amplificações está de acordo com o tamanho de 111 pb esperado para o *Irg1* e estava presente em todas as amostras. O amplicon abaixo de 100 pb não foi identificado, sugere-se uma amplificação inespecífica. Não foram observados amplicons com o tamanho esperado para o *Irg1* editado de 59 pb.

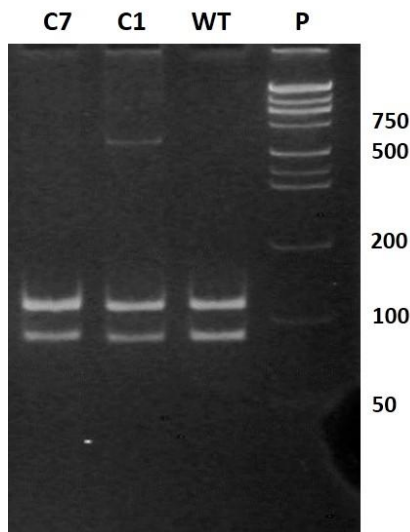


Figura 13. Reação de PCR do DNA derivado de clones de células RAW264.7 transfectados. Eletroforese em gel de bisacrilamida 10 %. P: Marcador de peso molecular 100 pb *Low Scale DNA Ladder*. C: clone. Iniciadores utilizados: *mIRG1(qPCR) Fwd e Rev*.

Estes resultados confirmam que não foram selecionados clones de células RAW264.7 deficientes para o gene *Irg1*. Está em andamento uma metodologia alternativa para geração das células deficientes para *Irg1*.

4.2. SUPEREXPRESSÃO DE *IRG1* EM CÉLULAS A549

Outra forma de analisar a influência da produção endógena de IA em infecções virais é através da superexpressão do *Irg1* em células não produtoras desta enzima. Para isso, iniciou-se a construção de um vetor de expressão contendo o gene *Irg1* murino.

4.2.1. Construção dos vetores

Para obtenção da sequência de *Irg1* murino, macrófagos imortalizados (M ϕ I) foram estimulados com 100 ng/mL de LPS e incubados por 6 h. Após este período, foi extraído o RNA das amostras para síntese de cDNA. O cDNA foi utilizado para realização do qPCR para confirmação do aumento na expressão de *Irg1*. Como controle endógeno, utilizou-se *GAPDH* (**Figura 14**). Foi observado um aumento de aproximadamente 250 vezes na expressão de *Irg1* em M ϕ I estimulados com LPS comparado com as células não estimuladas.

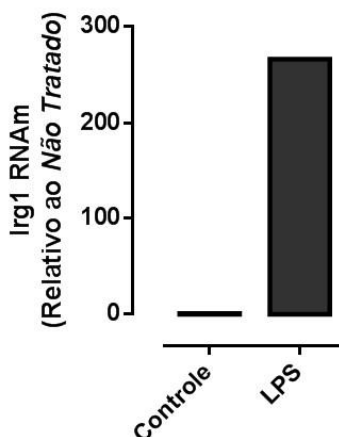


Figura 14. Expressão relativa de *Irg1* em macrófagos murinos imortalizados. Células estimuladas com 100 ng/mL de LPS por 6 h. Controle: Sem estímulo; Controle endógeno: *GAPDH*.

Com a confirmação na expressão de *Irg1*, o cDNA dos MφI foi utilizado para amplificação do gene *Irg1* através de uma reação de PCR. O produto de PCR foi clonado no vetor de clonagem pGEM e inserido em bactérias *E. coli* cepa *TOP10f*, da qual foi realizada uma reação PCR de colônia (**Figura 15**). Das quatro colônias testadas, duas foram positivas para o vetor *pGEM/mIRG1*, com amplificação de 1695 pb.

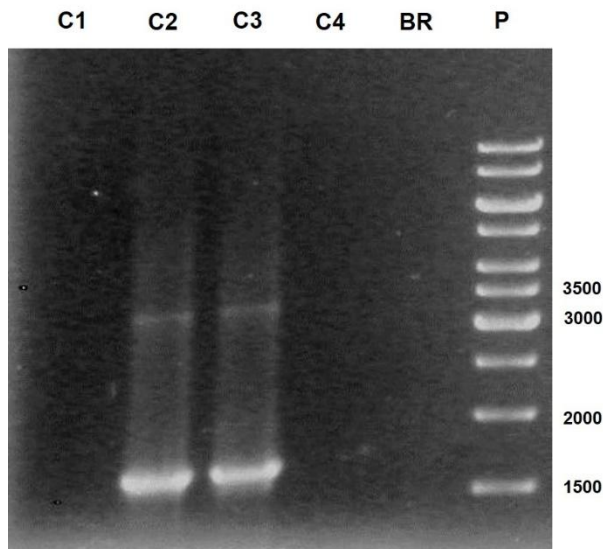


Figura 15. PCR de colônia para identificação de *pGEM/mIrg1*. Eletroforese em gel de agarose 1 % do vetor *pGEM/mIrg1*. P: Marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. C: colônia. BR: Branco. Iniciadores utilizados: *T7-Fwd* e *M13-Rev*.

A colônia 2 (C2) foi utilizada para purificação do vetor. O produto purificado foi dosado e enviado para sequenciamento (**Figura 16**). Através do alinhamento das amostras sequenciadas (*Clustal Omega*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS *et al.*, 2011), foram observados dois nucleotídeos diferentes em comparação com a sequência controle *Acod* (*GenBank*).

DNA

```

Seq      GCCTGTGCTCGCTGCTCGACGGTAGCATCACTGTCCCATCTTCCACAGCCAGCAGGTC
mIRg1    GCCTGTGCTCGCTGCTCGACGGTAGCATCACTGTCCCATCTTCCACAGCCAGCAGGTC
          ****

Seq      AATAGGCCTCAGGTGAGAGAGTTGCTCAAGAAGGTGAAGCTGGAGCATCCTCCTGACAA
mIRg1    AATAGGCCTCAGGTGAGAGAGTTGCTCAAGAAGGTGAAGCTGGAGCATCCTCCTGACAA
          ****

Seq      CCGCCAAGCTTCGACACGCTATACTGTGAAATAAGCATCACTCTAAAGGACGGGACCACT
mIRg1    CCGCCAAGCTTCGACACGCTATACTGTGAAATAAGCATCACTCTAAAGGACGGGACCACT
          ****

Seq      TTCACCGAGCGCTCTGACACCTTCTATGGTCACTGGAGGAAACCACTGAGCCAGGAGAT
mIRg1    TTCACCGAGCGCTCTGACACCTTCTATGGTCACTGGAGGAAACCACTGAGCCAGGAGAT
          ****

Seq      CTGCGCAACAAGTTCGAGCCAATGCCTCAAAGATGCTATGCAGGGACACGGTGGAAAGC
mIRg1    CTGCGCAACAAGTTCGAGCCAATGCCTCAAAGATGCTATGCAGGGACACGGTGGAAAGC
          ****

```

Figura 16. Alinhamento dos nucleotídeos do *pGEM/mIRg1* sequenciada. O alinhamento foi realizado utilizando a sequência controle *mIRg1* (*Acod* – *GenBank*).

Em seguida, foi realizada uma tradução *in silico* para aminoácidos das amostras sequenciadas (*ExPasy*, <http://web.expasy.org/translate/>), a qual foi comparada com a sequência controle P0C2X0 (*UniProt*). Foi observado que os nucleotídeos alterados também geraram aminácidos diferentes (**Figura 17**).

Proteína

mIRG1	GFGAFYANYSPEDLPSLDSHIWLDDQQDVAFKSFPAHLATHWVADAAAARVRLVTPERA
Seq	GFGAFYANYSPEDLPSLDSHIWLDDQQDVAFKSFPAHLATHWVADAAAARVRLVTPERA *****
mIRG1	LFPADHIERIVLRIPDVQYVNRPPDSEHEARHSFQYVACASLLDGSITVPSFHSQQVNR
Seq	LFPADHIERIVLRIPDVQYVNRPPDSEHEARHSFQYVACASLLDGSITVPSLHFSQQVNR *****
mIRG1	PQVRELLKKVKLEHPPDNPPSFDTLYCEISITLKDGTTFTERSDFYGHWRKPLSQEDNR
Seq	PQVRELLKKVKLEHPPDNPPSFDTLYCEISITLKDGTTFTERSDFYGHWRKPLSQGDNR *****
mIRG1	NKFRANASKMLCRDVTESLITVVEKLEDEDCSVLTRLKGPVSQDEASKLSSMSSFHT
Seq	NKFRANASKMLCRDVTESLITVVEKLEDEDCSVLTRLKGPVSQDEASKLSSMSSFHT *****
mIRG1	TLPRFTNI
Seq	TLPRFTNI *****

Figura 17. Alinhamento dos aminoácidos do *pGEM/mIrg1* sequenciada. O alinhamento foi realizado utilizando a sequência controle mIRG1 (*P0C2X0 – UniProt*).

Este resultado sugere que ocorreram duas mutações no gene *Irg1* durante a construção do vetor. Para trocar os nucleotídeos indesejados, foi realizada a técnica de mutagênese.

4.2.2. Mutagênese

Para trocar os dois nucleotídeos alterados do vetor *pGEM/mIrg1*, foram realizadas reações de metilação e mutagênese para as duas mutações, utilizando o protocolo do fabricante. Em seguida, foi realizado a reação de recombinação das amostras que passaram pelas reação de mutagênese. O produto da reação de recombinação foi inserido em bactérias *E. coli* cepa *DH5α-T1*. Após o tempo de incubação das bactérias em meio LB-Ágar, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, foi observado o crescimento de duas colônias. Em seguida, foi realizada uma PCR de colônia (**Figura 18**), na qual foi observado amplificação do vetor no tamanho esperado de 1695 pb nas duas colônias analisadas.

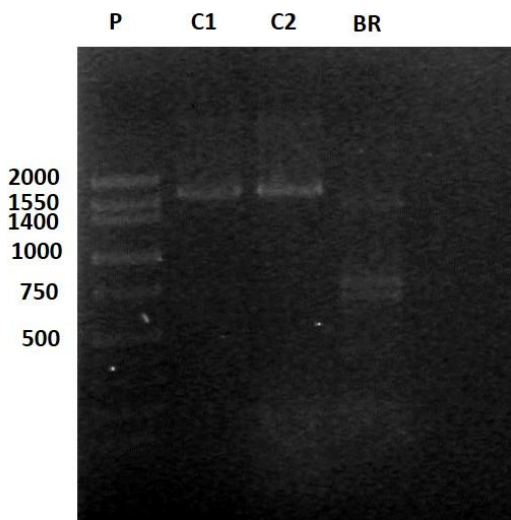


Figura 18. PCR de colônia para identificação de *pGEM/mIrg1* após mutagênese. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto da recombinação do vetor *pGEM/mIRG1* (C1 e C2). P: Marcador de peso molecular 100 *pb* *Low Scale DNA Ladder*. C: colônia. BR: Branco. Iniciadores utilizados: *T7-Fwd* e *M13-Rev*.

Os vetores *pGEM/mIrg1* mutados, presentes nas duas colônias, foram purificados e enviados para sequenciamento (**Figura 19**). As sequências foram alinhadas (*Clustal Omega*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS *et al.*, 2011) e mostram que a sequência da amostra C1, na qual foi realizada a reação de mutagênese, permaneceu com os nucleotídeos alterados. O mesmo resultado foi observado para a amostra C2.



```

mIRG1_Mutagênese_C1      GCCTGTGCCTCGCTGCTCGACGGTAGCATCACTGTCCCATCCCTCCACAGCCAGCAGGTC
mIRG1_Sequenciado        GCCTGTGCCTCGCTGCTCGACGGTAGCATCACTGTCCCATCCCTCCACAGCCAGCAGGTC
mIRG1_teorico             GCCTGTGCCTCGCTGCTCGACGGTAGCATCACTGTCCCATCCCTCCACAGCCAGCAGGTC
                           *****

mIRG1_Mutagênese_C1      AATAGGCCTCANGTGAGAGAGTTGCTCAAGAAGGTGAAGCTGGAGCATCCTCTGACAAC
mIRG1_Sequenciado        AATAGGCCTCAGGTGAGAGAGTTGCTCAAGAAGGTGAAGCTGGAGCATCCTCTGACAAC
mIRG1_teorico             AATAGGCCTCAGGTGAGAGAGTTGCTCAAGAAGGTGAAGCTGGAGCATCCTCTGACAAC
                           *****

mIRG1_Mutagênese_C1      CCGCCAAGCTTCGACACGCTATACTGTGAAATAAGCATCACTCTAAAGGACGGGACCACT
mIRG1_Sequenciado        CCGCCAAGCTTCGACACGCTATACTGTGAAATAAGCATCACTCTAAAGGACGGGACCACT
mIRG1_teorico             CCGCCAAGCTTCGACACGCTATACTGTGAAATAAGCATCACTCTAAAGGACGGGACCACT
                           *****

mIRG1_Mutagênese_C1      TTCACCGAGCGCTCTGACACCTTCTATGGTCACTGGAGGAAACCACTGAGCCAGGGAGAT
mIRG1_Sequenciado        TTCACCGAGCGCTCTGACACCTTCTATGGTCACTGGAGGAAACCACTGAGCCAGGGAGAT
mIRG1_teorico             TTCACCGAGCGCTCTGACACCTTCTATGGTCACTGGAGGAAACCACTGAGCCAGGAAGAT
                           *****

```

Figura 19. Alinhamento dos nucleotídeos do *pGEM/mIrg1(C1)* após a reação de mutagênese. O alinhamento foi realizando utilizando a sequência controle *mIrg1* (*Acod* – *GenBank*) e a sequência do *pGEM/mIrg1* antes da reação de mutagênese.

Com estes resultados, ainda não foi possível obter o vetor *pGEM/mIrg1* com a sequência esperada. A repetição da metodologia para construção do vetor *pGEM/mIrg1* está em andamento, utilizando macrófagos murinos derivados de medula óssea. Esta ferramenta é fundamental para a avaliação da produção endógena de IA, através da enzima IRG1 e seu impacto em infecções virais.

4.3. CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ITACÔNICO E SEU EFEITO ANTIVIRAL

Com o objetivo de analisar as propriedades antivirais do IA de maneira exógena, células de linhagem não produtoras deste metabólito foram infectadas por vírus e tratadas com IA, em concentrações semelhantes às produzidas por macrófagos da linhagem RAW264.7, cerca de 8 mM (MICHELUCCI *et al.*, 2013).

Inicialmente foi avaliado se a adição de IA é citotóxica para células de linhagem. Foram administrados diferentes concentrações de IA em células HEK293 por 24 h. A morte celular foi avaliada pela adição de PI nas amostras e aquisição por citometria de fluxo (**Figura 20**). A concentração de 20 mM foi utilizado como um controle positivo para morte celular baseado em resultados preliminares. Comparado com a amostra controle (sem tratamento), observa-se que as concentrações

até 7 mM de IA não são citotóxicas. Como esperado, na concentração de 20 mM a grande maioria das células estavam mortas. Resultados semelhantes foram obtidos em células A549 e RAW264.7.

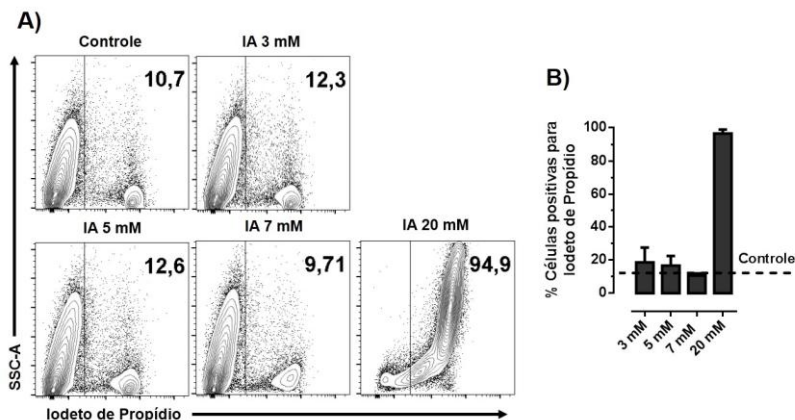


Figura 20. Citotoxicidade do IA analisada por citometria de fluxo. Células HEK293 foram tratadas com diferentes concentrações de IA por 24 h. **A)** Porcentagem de células marcadas por iodeto de propídio expressa em gráficos do tipo *contour plot*. **B)** Porcentagem de células marcadas por iodeto de propídio expressa em gráfico de barras. Controle: Não tratado.

As concentrações de IA não citotóxicas foram utilizadas para analisar sua atividade em células infectadas por vírus. Para isso, as células HEK293 foram infectadas pelo VSveGFP em MOI de 0,1 por 90 min, sendo que esta incubação refere-se ao período de adsorção viral. Em seguida as células foram lavadas, tratadas com diferentes concentrações de IA e incubadas novamente por 14 h. Este tempo de incubação foi previamente padronizado. As células foram analisadas por citometria de fluxo (**Figura 21**). O IA diminuiu a infecção das células (GFP positivas) a partir da concentração de 5 mM. Resultados semelhantes foram observados em células A549 e RAW264.7.

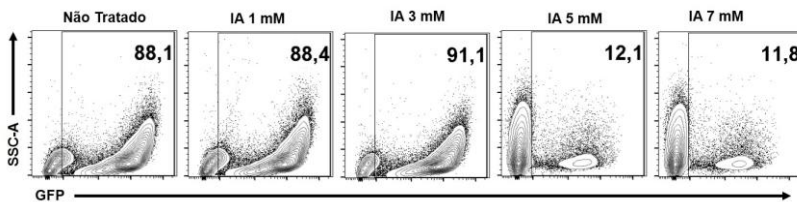


Figura 21. Atividade antiviral do IA analisadas por citometria de fluxo. Células HEK293 infectadas por VSVeGFP (MOI 0,1) e tratadas com diferentes concentrações de IA por 14 h. Porcentagem de células infectadas (GFP positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*.

O resultado do experimento anterior foi expresso em gráfico de barras (**Figura 22A**), demonstrando a porcentagem de infecção relativo ao grupo sem tratamento. No tratamento de até 3 mM de IA não foi observado diferença em relação ao grupo não tratado. A partir do tratamento com 5 mM de IA observou-se redução de até 90 % de infecção. Neste mesmo experimento foi avaliada a morte celular através da marcação por PI (**Figura 22B**). Foi observado que a porcentagem de células mortas no grupo infectado sem tratamento foi 3 vezes maior em comparação com o controle não infectado. Esta porcentagem diminuiu a partir do tratamento com 3 mM de IA, alcançando níveis próximos ao controle (sem infecção) nos tratamentos com 5 ou 7 mM.

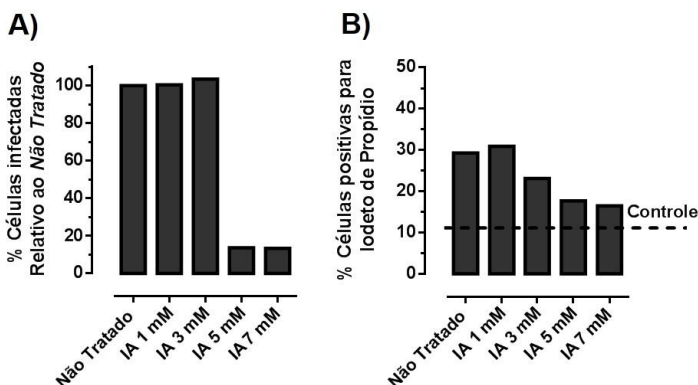


Figura 22. Atividade antiviral do IA. Células HEK293 infectadas por VSVeGFP (MOI 0,05) e tratadas com diferentes concentrações de IA por 14 h. **A)** Portentagem de infecção (GFP positivo) relativo ao grupo não Tratado com IA. **B)** Porcentagem de células não viáveis (marcadas por PI). Controle: Não infectado e não tratado.

Este conjunto de resultados sugere que o IA possui atividade antiviral contra o VSVeGFP. A partir deste experimento, a concentração de 5 mM de IA foi utilizada como padrão de tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos em células A549 e RAW264.7 infectadas com o mesmo vírus. Contudo, foi observado que as células A549 controle (sem infecção) possui maior estabilidade em relação à morte celular quando comparado com as células HEK293 (dados não mostrados). Por este motivo, nos experimentos seguintes as células HEK293 não foram mais utilizadas.

Para avaliar se o IA possui atividade antiviral em diferentes títulos virais, células A549 foram infectadas por VSVeGFP em diferentes MOIs. Após 90 min de incubação, as células foram tratadas com 5 mM de IA, incubadas novamente por 14 h e avaliadas por citometria de fluxo (**Figuras 23**). Pode-se observar que o tratamento reduziu a infecção viral em todos os MOIs utilizados. No entanto, a infecção sob o tratamento com IA coincide com a porcentagem de células infectadas antes do tratamento, ou seja, durante o tempo de adsorção viral.

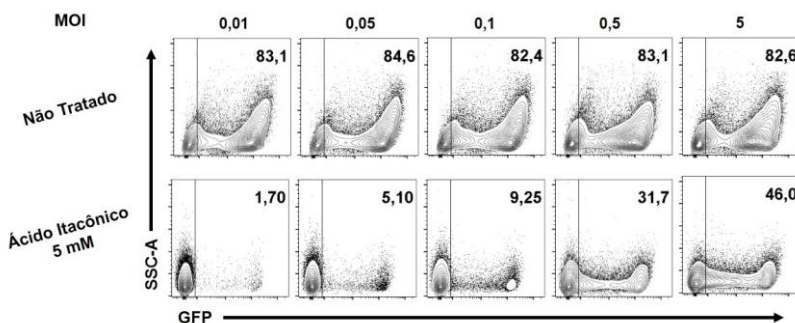


Figura 23. Inibição de VSVeGFP em diferentes MOIs. Células A549 infectadas por VSVeGFP (MOIs 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 5) e tratadas com 5 mM IA por 14 h. Porcentagem de células infectadas (GFP positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*.

O resultado do experimento anterior foi expresso em gráfico de barras na **Figura 24A** e mostra a porcentagem de infecção relativo ao grupo sem tratamento. Maiores MOIs diminuíram o efeito antiviral exercido pelo IA, com cerca de 98 % de inibição na MOI de 0,01 e alcançando cerca de 50 % na MOI de 5. Como parâmetro para analisar a produção viral e também a viabilidade dos vírus liberados, o

sobrenadante das células infectadas foi titulado (**Figura 24B**). Nas MOIs de até 0,1, foi observado redução de cerca de 2 logs nos títulos virais. Contudo, nas MOIs de 0,5 e 5 não foi observado redução nos títulos virais quando tratados com IA. A **Figura 24C** demonstra que, em comparação com as células infectadas que não receberam tratamento, todos os grupos tratados com IA diminuíram a porcentagem de célula mortas, alcançando níveis semelhantes ao controle sem infecção.

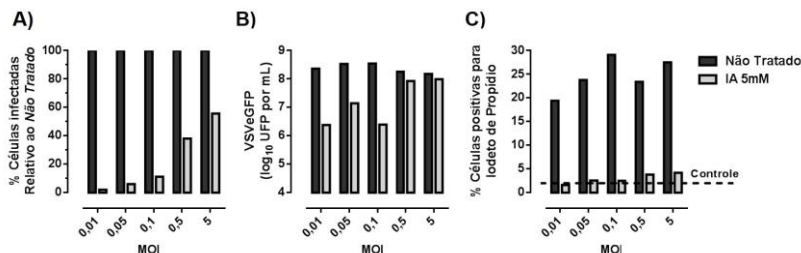


Figura 24. Atividade antiviral do IA em diferentes MOIs de VSveGFP. Células A549 infectadas por VSveGFP (MOI 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 ou 5) e tratadas com 5 mM de IA por 14 h. **A)** Porcentagem de infecção (GFP positivo) relativo ao grupo não tratado com IA de cada MOI. **B)** Porcentagem de células não viáveis (marcadas por iodeto de propídio). **C)** Titulação de VSveGFP no sobrenadante de células A549 tratadas com IA. Controle: Não infectado e sem tratamento.

Este conjunto de resultados sugere que o IA não afeta a viabilidade dos vírus liberados pelas células infectadas. Entretanto, o mecanismo de ação do IA pode estar associado com o bloqueio na entrada dos vírus nas células adjacentes, impedindo o espalhamento viral. A partir deste experimento, a infecção por VSveGFP foi padronizada em MOI de 0,05.

Com base nos resultados anteriores, foi avaliado a influência do IA no espalhamento viral. Para esta análise, células VERO (utilizadas para titulação de VSV) foram infectadas com VSveGFP (50 UFPs por poço). Após 90 min de incubação, as células foram lavadas e tratadas com 5 mM de IA em meio de cultura com 1,6 % CMC, aumentando a viscosidade do meio de cultura, para que o vírus liberado infecte as células adjacentes. As células foram incubadas novamente por 24 h. Após a incubação, as células foram marcadas com DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência (**Figura 25A**). Foi observado que o grupo contendo células infectadas e não tratadas com IA obteve

espalhamento viral com um tamanho de aproximadamente 480 μm de perímetro. Contudo, no grupo tratado com IA foi observado que as células infectadas apresentaram-se isoladas, sem espalhamento. A **Figura 25B** demonstra a média do perímetro das UFPs medidas nas células tratadas e não tratadas e o resultado foi consistente com a redução no tamanho das UFPs.

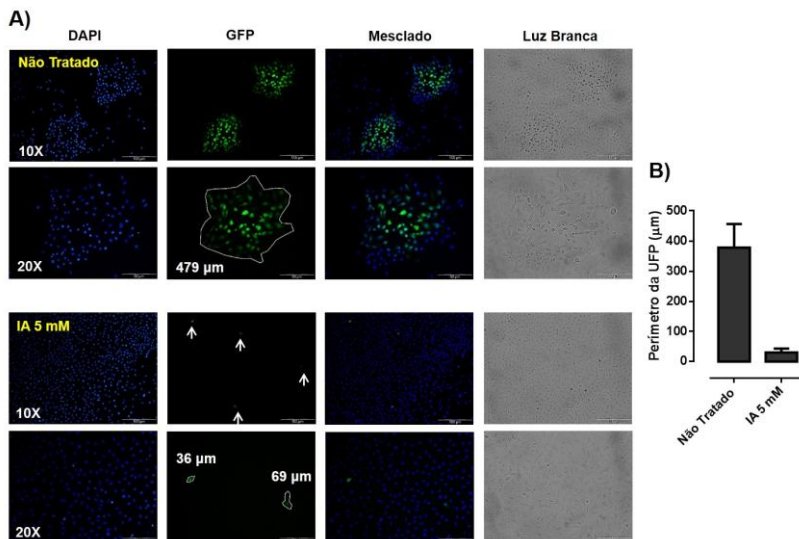


Figura 25. Efeito do IA na propagação viral. Células VERO infectadas por VSVeGFP (50 UFPs por poço) e tratadas com 5 mM de IA por 24 h em meio semi-sólido contendo CMC. **A)** Células marcadas com DAPI (núcleo) e analisadas por microscopia óptica de fluorescência. **B)** Medida do perímetro da UFP. O resultado representa a média de 60 UFPs de cada grupo de um experimento independente. Medida de perímetro analisado pelo *software ImageJ*.

Este resultado sugere que o efeito antiviral do IA pode ocorrer pela inibição do espalhamento viral.

4.4. INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÁCIDO ITACÔNICO

O meio de cultura utilizado nos experimentos possui um indicador colorimétrico de pH e na concentração de 5 mM de IA foi observado alteração nesta coloração. Para verificar se o bloqueio no espalhamento viral causado pelo IA está associado com a diminuição do pH, primeiramente foram mensurados o pH de diferentes concentrações de IA diluídas em meio DMEM-F12 incompleto (**Figura 26**). O pH do meio acidificou com o aumento da concentração de IA. A concentração de 5 mM, utilizada nos experimentos, levou ao pH 6,8.

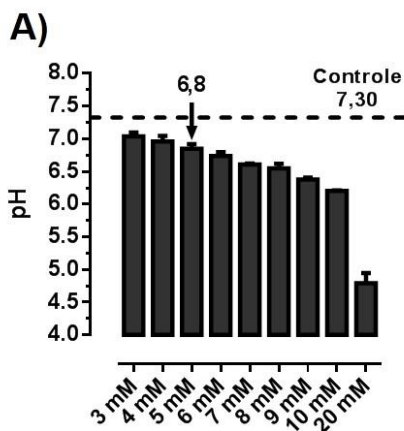


Figura 26. Análise do pH de diferentes concentrações de IA. Mensuração do pH de IA em solução com o meio DMEM-F12 incompleto. Resultado representativo de três experimentos independentes. Controle: Sem tratamento.

Para verificar se o pH do meio está relacionado com o mecanismo antiviral de IA no vírus VSveGFP, células A549 foram infectadas com o vírus em MOI de 0,05. Após 90 min de infecção, as células foram lavadas e tratadas com 5 mM de IA, com 11 mM de HCl ou com a mistura contendo 5 mM de IA e 11 mM de NaOH. As concentrações de HCl e de NaOH foram previamente padronizadas. Após os tratamentos, as células foram incubadas por 14 h e adquiridas por citometria de fluxo. Como controle, o pH dos meios com os tratamentos foram mensurados antes da transferências para células (**Figura 27A**). A concentração de 11 mM de HCl forneceu um pH

semelhante à 5 mM de IA, e a associação contendo 5 mM de IA e 11 mM de NaOH forneceu um pH próximo ao do controle (sem tratamento). O resultado da citometria de fluxo (**Figura 27B**) demonstra que o grupo tratado com HCl reduziu a infecção de forma semelhante ao tratamento com 5 mM de IA. Entretanto, o grupo que foi adicionado IA e NaOH não obteve diferença na infecção quando comparado com o grupo sem tratamento.

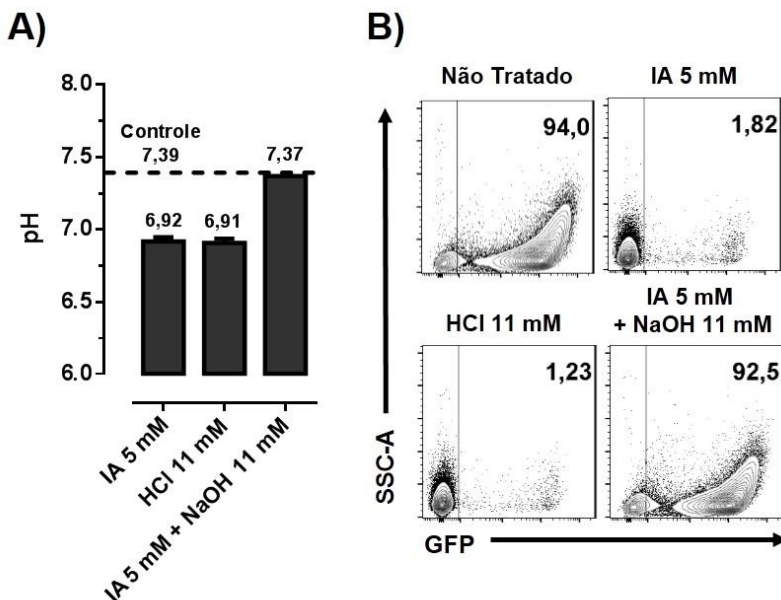


Figura 27. Influência do pH na infecção de VSVeGFP. **A)** Controle do pH do meio de cultura contendo os tratamentos. **B)** Células A549 infectadas por VSVeGFP (MOI 0,05) durante 90 min e tratadas com 5 mM de IA, 11 mM de HCl ou 5 mM de IA mais 11 mM de NaOH por 14 h. Portentagem de células infectadas (GFP positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*.

O resultado do experimento anterior também foi expresso na **Figura 28A**, em gráfico de barras, demonstrando a porcentagem de células infectadas relativas ao grupo sem tratamento. As células tratadas com 5 mM de IA ou 11 mM de HCl diminuíram cerca de 99 % de infecção comparado com o grupo não tratado. Utilizando a mesma comparação, não foi observado diferença na infecção das células tratadas com IA + NaOH. O sobrenadante das células infectadas foi coletado para quantificação viral por titulação (**Figura 28B**). O

sobrenadante de células não infectadas foi titulado como um controle negativo e não foi observado a presença de UFPs. Os tratamentos em que o pH está acidificado obtiveram redução de aproximadamente 2 logs nos títulos virais. Quando o pH do meio com 5 mM de IA foi ajustado com 11 mM de NaOH, não foi observado diferença no título do vírus, comparado com o grupo sem tratamento. Estes resultados foram reproduzidos em células HEK293.

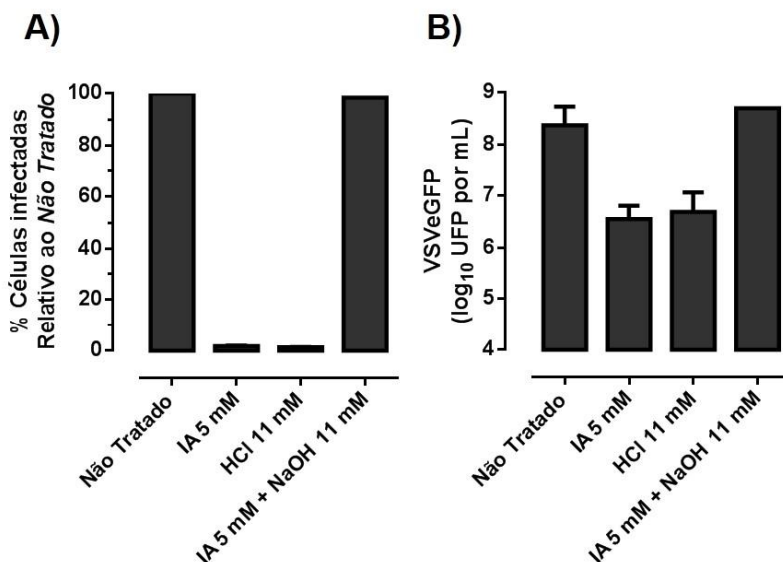


Figura 28. Influência do pH na infecção de VSVeGFP. Células A549 infectadas por VSVeGFP (MOI 0,05) e tratadas com 5 mM de IA, 11 mM HCl ou a mistura de 5 mM de IA com 11 mM de NaOH, com uma incubação de 14 h. **A)** Portentagem de infecção (GFP positivo) relativo ao grupo *Não Tratado*. **B)** Titulação VSVeGFP no sobrenadante de células A549. Controle: Não infectado e não tratado.

Este conjunto de resultados demonstra que a atividade antiviral do IA está correlacionado com a acidificação do meio.

4.4.1. Geração de VSVeGFP resistente ao pH 6,8

Para explorar o efeito da acidificação do pH como atividade antiviral do IA e dissociar o pH de outro possível efeito, foi

desenvolvido uma metodologia para geração de VSVeGFP resistente ao pH 6.8. Para isso, células VERO foram infectadas por VSVeGFP em MOI de 0.01. Após 90 min de incubação, as células foram lavadas e tratadas com meio em pH 6.8, ajustado com 11 mM de HCl. Em seguida, as células foram incubadas por 48 h. Através da microscopia de fluorescência, observou-se um crescimento viral em 1 de 24 replicatas, como demonstrado na **Figura 29**.

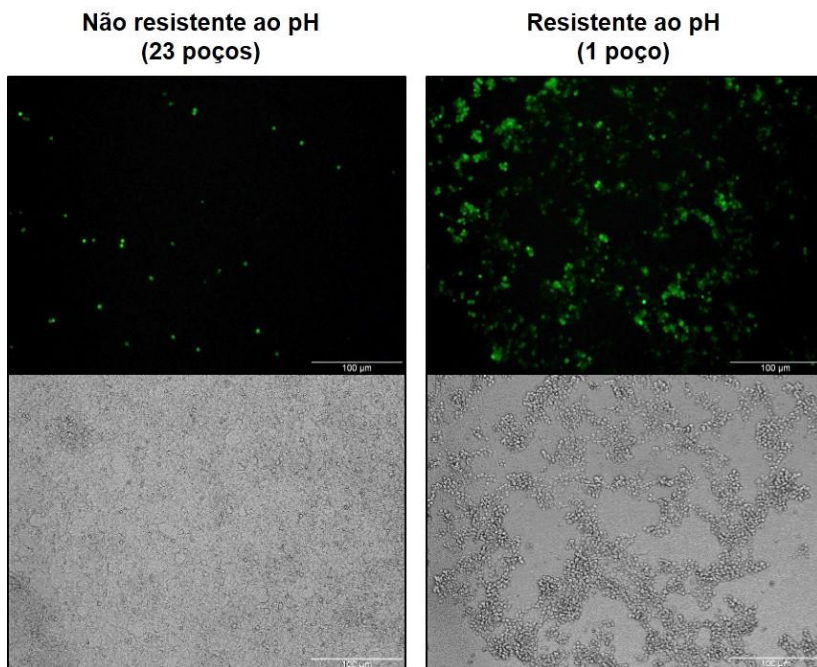


Figura 29. Geração de VSVeGFP resistente ao pH 6,8. Células VERO infectadas por VSVeGFP (MOI 0,05) em pH de aproximadamente 6,8 (ajustado com HCl) por 48 h. Imagens analisadas por microscopia óptica de fluorescência.

O resultado sugere que ocorreram mutações no vírus VSVeGFP em um dos poços, que viabilizaram o espalhamento do vírus nas células adjacentes.

O sobrenadante das células em que houve crescimento viral foi coletado e expandido em garrafas de cultura contendo células VERO em meio acidificado com 11 mM de HCl e incubado por 48 h. Após a incubação, o sobrenadante foi transferido para outra garrafa de cultura

nas mesmas condições anteriores. Este procedimento foi realizado mais uma vez, totalizando três passagens virais. Na última expansão, o sobrenadante foi transferido para placas de cultura contendo células VERO com CMC e em pH 6,8 ajustado com 11 mM de HCl. O objetivo foi avaliar o espalhamento viral do vírus resistente (denominado VSVgRes) e realizar a separação do clone viral mutado. Como controle, o vírus sem resistência ao pH 6,8 (denominado VSVgWT) foi incubado sem tratamento (pH 7,2) ou com 11 mM de HCl (pH 6,8) (**Figura 30**). Através de microscopia de fluorescência, não foi observado expansão viral de VSVgWT em pH 6,8. O VSVgRes foi capaz de expandir em pH acidificado. No entanto, foi observado que o tamanho da UFP do VSVgRes foi menor comparado com o tamanho da UFP do vírus VSVgWT em pH 7,2.

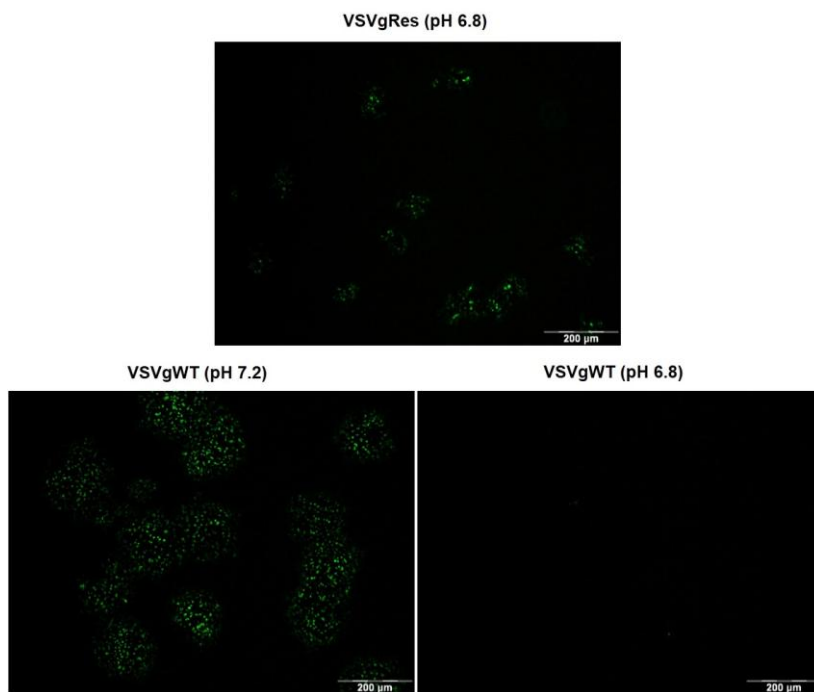


Figura 30. Análise de espalhamento viral. Células VERO infectadas por VSVgWT (pH 7,2 ou 6,8) ou VSVgRes (pH 6,8). Imagens analisadas por microscopia óptica de fluorescência. Aumento de 4X.

Sugere-se que o vírus VSVgRes é resistente ao pH 6,8, mas apresenta uma velocidade de espalhamento menor que o VSVgWT.

Das UFPs geradas pelo VSVgRes em pH 6,8, uma delas foi selecionada para separação clonal. Para escolha e seleção da UFP a ser utilizada, foram observados alguns parâmetros como: a maior UFP, com positividade para GFP e com uma distância segura em relação às outras UFPs, a fim de evitar a coleta de dois ou mais clones ao mesmo tempo. A UFP selecionada foi coletada e transferida para garrafas de cultura contendo células VERO em pH 6,8, ajustado com 11 mM de HCl para expansão viral. Com o objetivo de obter um clone viral com alta pureza, o procedimento de separação clonal e expansão do vírus foi realizado em três passagens nas mesmas condições.

Na última separação clonal, o vírus foi expandido mais uma vez para ser alíquotado e quantificado por titulação. O título do vírus foi de 1×10^7 UFP/mL.

4.4.2. Sequenciamento do VSVgRes

Martinez e Wertz (2005) geraram vírus VSV resistentes ao pH acidificado e demonstraram mutações pontuais na glicoproteína G do vírus (MARTINEZ e WERTZ, 2005). Para verificar se ocorreram mutações na glicoproteína G do VSVgRes, foi realizado um sequenciamento deste vírus, juntamente com o vírus VSVgWT. No preparo das amostras, os RNAs foram extraídos e convertidos para cDNA. A partir do cDNA, foi realizada uma PCR para amplificação da glicoproteína G. O produto de PCR foi ligado no vetor de clonagem *pGEM* e inserido em bactérias *E. coli TOP10f'* quimio-competentes. Em seguida as bactérias foram plaqueadas em meio LB-Ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL). Após cerca de 16 h de crescimento, cinco colônias de cada vírus foram coletadas. A presença do vetor *pGEM/VSVgRes* ou *pGEM/VSVgWT* nas colônias selecionadas foi confirmada por PCR de colônia (**Figura 31**). Duas colônias do VSVgWT foram positivas e três colônias do VSVgRes também foram positivas para glicoproteína G, observado pela amplificação em 2112 pb.

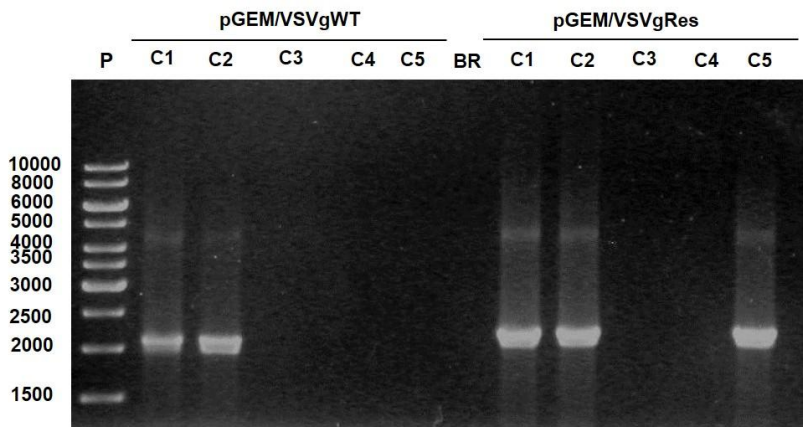


Figura 31. PCR de colônia para identificação de *pGEM/VSVgWT* e *Res*. Eletroforese em gel de agarose 1 % do produto de amplificação dos vetores *pGEM/VSVgWT* (C1 ao C5) e *pGEM/VSVgRes* (C1 ao C5). P: Marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. C: colônia. BR: Branco. Iniciadores utilizados: *T7-Fwd* e *GFP-Rev*.

As colônias *pGEM/VSVgWT* (C2) e *pGEM/VSVgRes* (C2) foram expandidas em meio LB líquido e o DNA plasmidial foi purificado. Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento. Os resultados do sequenciamento foram traduzidos em aminoácidos através do *software online ExPasy* (<http://web.expasy.org/translate/>) (GASTEIGER *et al.*, 2003) e foram alinhados (EMBL-EBI, *Clustal Omega*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS *et al.*, 2011) com duas sequências padrão de VSV sorotipo *Indiana*, derivados dos bancos de dados *UniProt* (P0C2X0) e *PDB* (*Protein DataBank*) (5I2M) (**Figura 32**). Foram identificados cinco aminoácidos diferentes entre as sequências analisadas. Apenas nas posições 110, 195 e 273 os dois controles e o VSVgWT apresentaram os mesmos aminoácidos, e o VSVgRes apresentou aminoácidos diferentes.

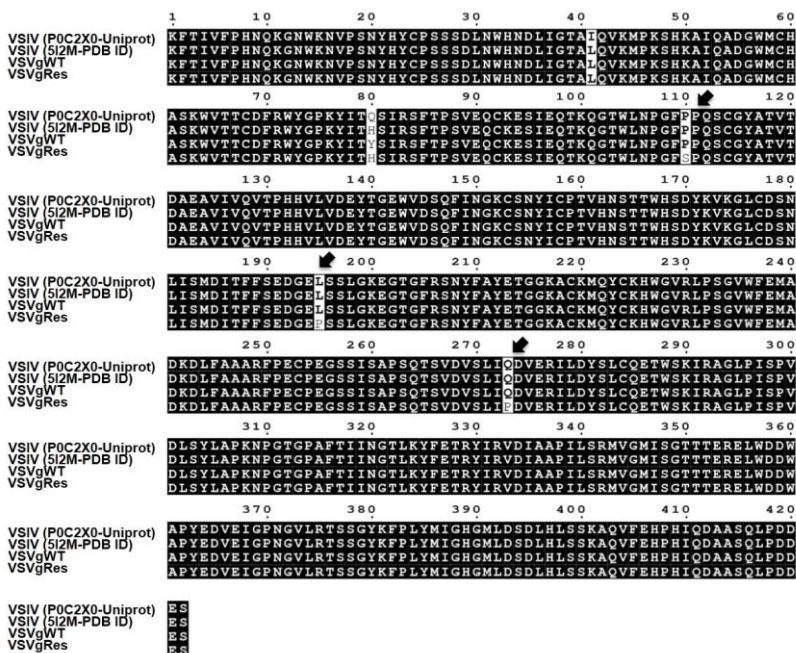


Figura 32. Alinhamento da glicoproteína-G de VSVgWT e VSVgRes. Os nucleotídeos sequenciados foram traduzidos para aminoácidos e alinhados com dois controles derivados dos bancos de dados *UniProt* e *PDB*.

Este resultado confirma a presença de mutações na glicoproteína G do vírus VSVgRes.

4.4.3. Modelagem estrutural das mutações na glicoproteína G de VSVgRes

Com o objetivo de analisar a diferença na estrutura da glicoproteína G dos vírus sequenciados, foi realizado um alinhamento da glicoproteína G cristalizada em sua forma pós-fusional do VSVgWT e VSVgRes, juntamente com o controle 5I2M (PDB), contendo as posições N-terminal e C-terminal (**Figura 33**). Ao comparar o RMS, que mede a diferença na área das estruturas alinhadas, observa-se que o RMS entre o VSVgRes e os controles é maior quando comparado com o RMS entre VSVgWT e o 5I2M. No entanto, esta diferença é baixa.

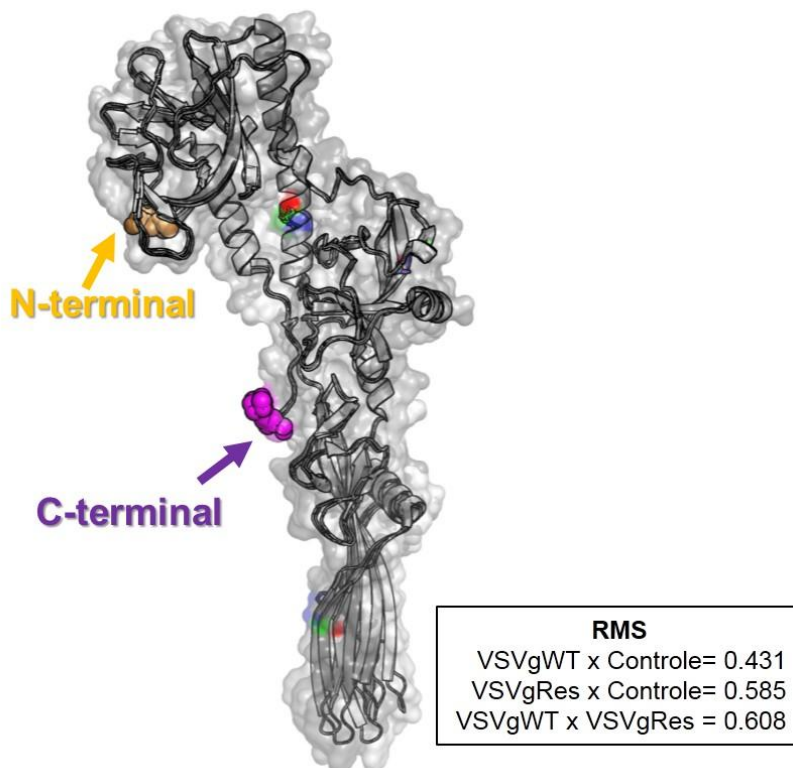


Figura 33. Comparação estrutural da glicoproteína-G dos vírus VSVeGFP (WT e Res) em sua forma pós-fusional. O alinhamento foi realizado juntamente com o controle 5I2M, derivado do banco de dados PDB. As regiões com as colorações azul, verde e vermelho sinalizam as mutações.

O resultado sugere que as mutações modificaram a conformação de algumas regiões da glicoproteína G do VSVgRes, mas com pouca alteração na estrutura.

Outro parâmetro que auxilia na análise do impacto das mutações na glicoproteína G do vírus é a avaliação dos aminoácidos mutados. A **Figura 34** exibe a localização das três mutações em que há mudanças apenas nos aminoácidos da glicoproteína G do VSVgRes em comparação com o VSVgWT e o controle 5I2M (PDB). Na posição 273, houve troca do resíduo glutamina (polar) por uma prolina (apolar). Na posição 195, o resíduo leucina (apolar) foi trocado por uma prolina

(apolar). Na posição 110, ocorreu uma troca de prolina (apolar) por uma serina (polar).

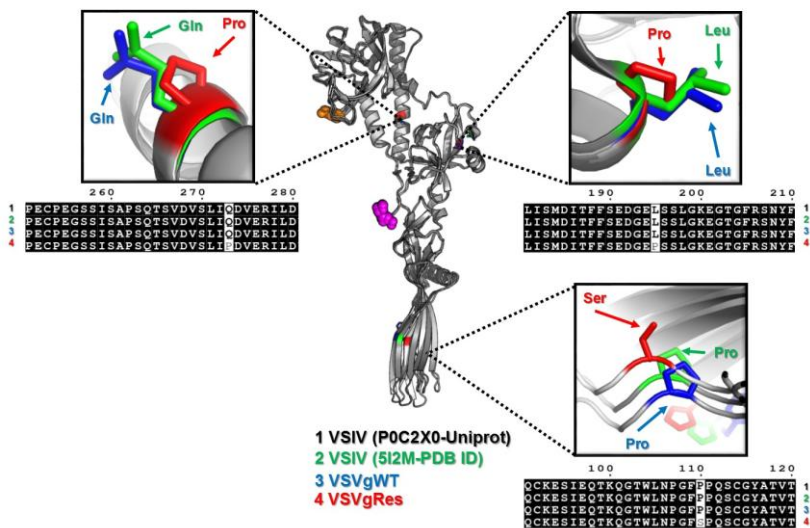


Figura 34. Localizações das mutações na glicoproteína-G do VSVeGFP resistente ao pH 6,8. O alinhamento das amostras sequenciadas (pGEM/VSVg (WT e Res)) foi realizado juntamente com dois controles derivados dos bancos de dados *Uniprot* (P0C2X0) e *PDB* (5I2M).

Os resultados demonstram que o VSVgRes sofreu mutações em diferentes regiões da glicoproteína G. Foi observado, em duas mutações, que ocorreram trocas entre aminoácidos polares e apolares. Sugere-se que estas regiões com alterações na polaridade modificaram a conformação da glicoproteína G e possibilitou a infecção nas células adjacentes em pH acidificado.

4.4.4. Atividade antiviral do ácido itacônico em VSVgRes.

Para testar o efeito do IA no VSVgRes, células A549 foram infectadas com os vírus VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05 por 90 min. Após a incubação, as células foram tratadas com 5 mM de IA (pH 6,91); 5 mM de MA, um análogo do IA (pH 6,94); 11 mM de HCl (pH 6,91) ou uma mistura contendo 5 mM de IA e 11 mM de NaOH (pH 7,37), com os pHs previamente calculados. As células foram incubadas

por 14 h e adquiridas por citometria de fluxo (**Figura 35**). Observou-se que nas células infectadas sem tratamento, o vírus VSVgRes infectou um menor número de células em comparação com o vírus VSVgWT. O resultado dos grupos infectados com o VSVgWT foi reproduzido em comparação com experimentos anteriores, com redução na porcentagem de células infectadas nos tratamentos com IA ou HCl e sem diferença no tratamento com IA + NaOH, em comparação com o grupo não tratado. O tratamento com MA obteve os mesmos resultados que os tratamentos com IA ou HCl. Quando as células infectadas por VSVgRes foram tratadas com IA, MA ou HCl, também observou-se redução na infecção em relação ao grupo não tratado, com maior redução no grupo com IA. No entanto, a infecção sob os tratamentos foi maior em comparação com a infecção pelo vírus VSVgWT sob os mesmos tratamentos. No grupo infectado com VSVgRes contendo IA + NaOH foi observado uma pequena redução na porcentagem de células infectadas comparado com o grupo sem tratamento.

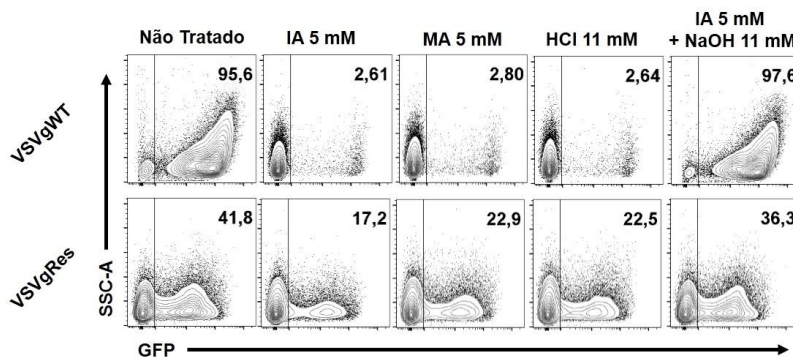


Figura 35. Células A549 infectadas por VSVgWT e VSVgRes em MOI de 0,05. Tratamento com IA 5 mM, MA 5 mM, 11 mM de HCl ou a mistura de IA 5 mM e NaOH 11 mM por 14 h. Portentagem de células infectadas (GFP positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*.

Estes resultados demonstram que o vírus VSVgRes tem uma menor taxa de propagação viral em comparação com o vírus VSVgWT no meio sem tratamento. O vírus VSVgRes teve menor sensibilidade ao pH acidificado quando comparado com VSVgWT, porém, não foi totalmente resistente nestas condições. Com este resultado, sugere-se que o IA pode ter um efeito adicional à diminuição do pH, não observado no tratamento com o MA ou com HCl.

O mesmo experimento foi plotado em gráfico de barras com a porcentagem de infecção relativa ao grupo sem tratamento. Nas mesmas amostras foi adicionado PI para a quantificação de morte celular durante a aquisição por citometria de fluxo. A **Figura 36A** demonstra a infecção de células A549 pelo vírus VSVgWT com diferentes tratamentos. Em comparação com o grupo não tratado, os tratamentos com IA, MA e HCl diminuíram cerca de 95 % de infecção, com porcentagem de células mortas abaixo do controle sem infecção e sem tratamento. O tratamento com IA mais NaOH não obteve diferença na infecção, porém, houve redução na porcentagem de células mortas quando comparadas com o grupo não tratado. A **Figura 36B** demonstra a infecção de células A549 por VSVgRes. O tratamento por MA ou HCl diminuiu de forma semelhante a infecção quando comparadas com o grupo de células sem tratamento. No entanto, o grupo tratado com IA obteve uma redução adicional de cerca de 15 % na taxa de infecção. A amostra com IA + NaOH apresentou cerca de 15 % de redução de células infectadas. Em relação à morte celular, todas as amostras infectadas, com ou sem tratamento, obtiveram menor porcentagem de células mortas em comparação com o controle sem infecção e sem tratamento.

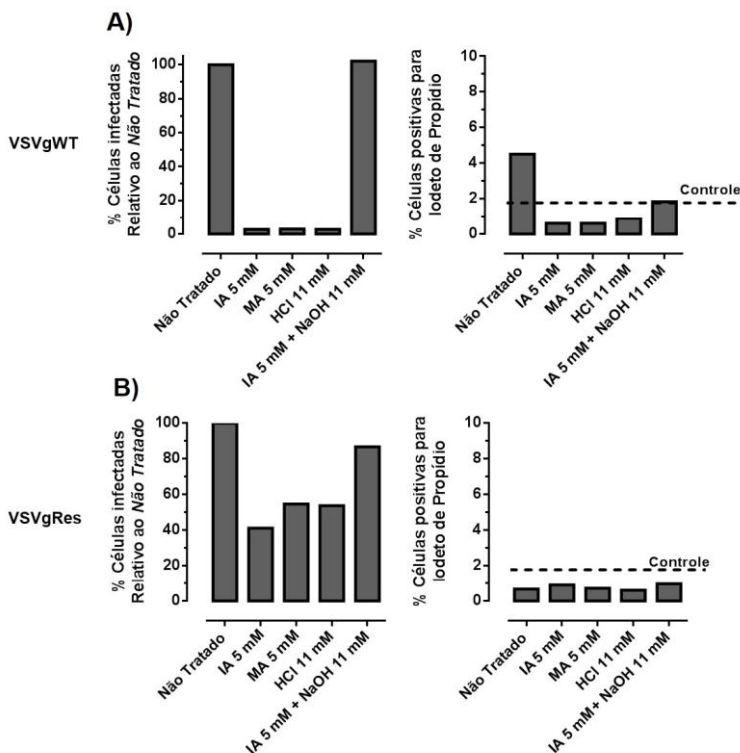


Figura 36. Células A549 infectadas por VSVgWT e VSVgRes em MOI de 0,05. Tratamento com IA 5 mM, MA 5 mM, 11 mM de HCl ou a mistura de IA 5 mM e NaOH 11 mM por 14 h. **(A)** Percentagem de infecção por VSVgWT relativo ao grupo Não Tratado; e percentagem de células não viáveis (marcadas por iodeto de propídio). **(B)** Percentagem de infecção por VSVgRes relativo ao grupo Não Tratado; e percentagem de células não viáveis (marcadas por iodeto de propídio). Controle: Sem infecção e sem tratamento.

Estes resultados também sugerem que o IA nas células infectadas por VSVgRes pode ter uma causa adicional ao do pH acidificado.

O sobrenadante coletado no experimento anterior foi utilizado para titulação do VSVgWT e VSVgRes com os diferentes tratamentos. Na **Figura 37A**, o vírus VSVgWT sem tratamento obteve o título de 1×10^8 UFP/mL, e tratamentos com IA, MA ou HCl diminuíram os títulos virais, com variações entre 1 e 2 logs de diferença em relação ao não tratado, sendo que o grupo com 11 mM de HCl obteve a maior redução. O tratamento com IA em combinação com NaOH não reduziu

os títulos virais do VSVgWT. Na **Figura 37B**, observa-se que o vírus VSVgRes sem tratamento obteve cerca de 1×10^6 UFP/mL, com títulos semelhantes nos grupos tratados com MA ou IA + NaOH. Os tratamentos com IA ou HCl reduziram os títulos virais, sendo que o tratamento com 11 mM de HCl obteve maior redução.

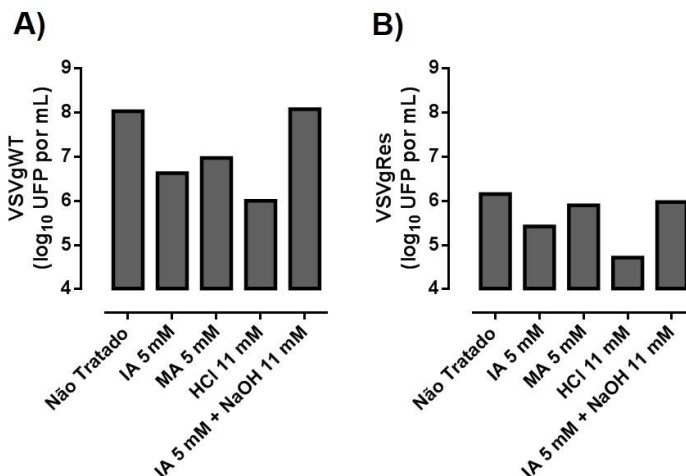


Figura 37. Titulação do sobrenadante de células A549 infectadas por VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05. Tratamento com 5 mM de IA, 5 mM de MA, 11 mM de HCl ou 5 mM IA mais 11 mM de NaOH por 14 h. (A) Infecção por VSVgWT. (B) Infecção por VSVgRes.

Estes resultados demonstram, principalmente, que o vírus VSVgRes possui menor taxa de produção viral em comparação com o VSVgWT em todas as condições analisadas. Sugere-se que a diminuição nos títulos virais pelo tratamento com IA está associado apenas pela diminuição do pH.

Para verificar se o vírus VSVgRes continua infectivo também em macrófagos, células RAW264.7 foram infectadas com os vírus VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05 e incubadas por 90 min. As células foram tratadas com 5 mM de IA, 5 mM de MA, 11 de HCl ou uma mistura de 5 mM de IA e 11 mM de NaOH. As células foram incubadas por 14 h, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80 °C para titulação e as células foram adquiridas por citometria de fluxo. Na **Figura 38**, os tratamentos com IA, MA ou HCl reduziram a infecção por VSVgWT de maneira semelhante. O tratamento em

combinação de IA e NaOH também diminuiu este parâmetro avaliado, mas com valores menos expressivos em comparação com as células sob os outros tratamentos. A porcentagem de células infectadas pelo vírus VSVgRes sem adição de tratamentos foi menor ao comparar com a infecção por VSVgWT. Quando tratadas com IA, MA ou HCl, observou-se uma redução na infecção pelo VSVgRes em comparação com o grupo não tratado e não foi observado diferença em comparação com a infecção do vírus VSVgWT com os mesmos tratamentos. No entanto, no tratamento com IA + NaOH foi observada uma redução pouco expressiva em relação ao grupo não tratado.

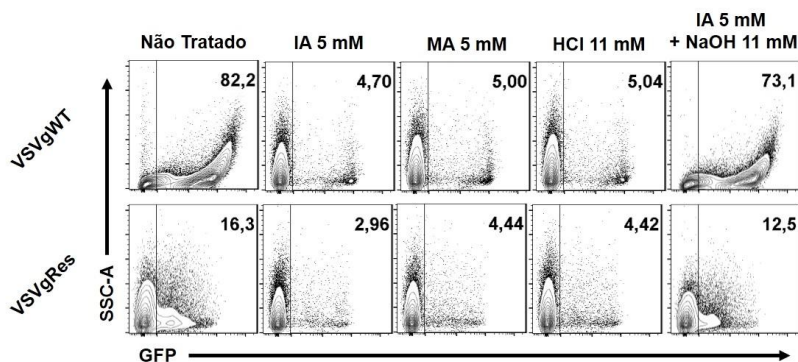


Figura 38. Células RAW264.7 infectadas por VSVgWT e VSVgRes em MOI de 0,05. Tratamento com IA 5 mM, MA 5 mM, 11 mM de HCl ou a mistura de IA 5 mM e NaOH 11 mM por 14 h. Portentagem de células infectadas (GFP positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*.

Estes resultados sugerem que o vírus VSVgRes é pouco infectivo em células RAW264.7 comparado com a infecção pelo VSVgWT. Além disso, não foi observado resistência ao pH no VSVgRes quando infectado em células RAW264.7.

O resultado do experimento anterior foi expresso em gráfico de barras, demonstrando a infecção relativa ao grupo sem tratamento. Além disso, nas mesmas amostras foi adicionado PI para quantificação de morte celular. A **Figura 39A** demonstra a infecção de células RAW264.7 pelo vírus VSVgWT com diferentes tratamentos. Em comparação com grupo não tratado, os tratamentos com IA, MA e HCl diminuíram cerca de 95 % das células infectadas, com porcentagem de células mortas similar aos do controle sem infecção e não tratadas O tratamento com IA + NaOH diminuiu cerca de 10 % de infecção, com

porcentagem de células mortas semelhante ao grupo infectado sem tratamento. A **Figura 39B** demonstra a infecção de células RAW264.7 por VSVgRes. Os tratamentos com IA, MA ou HCl reduziram entre 70 e 80 % das células infectadas em relação ao grupo sem tratamento e quando adicionado o IA + NaOH, observa-se uma redução de aproximadamente 20 %. Em relação à morte celular, todos os grupos obtiveram resultados semelhantes em comparação com o controle sem infecção.

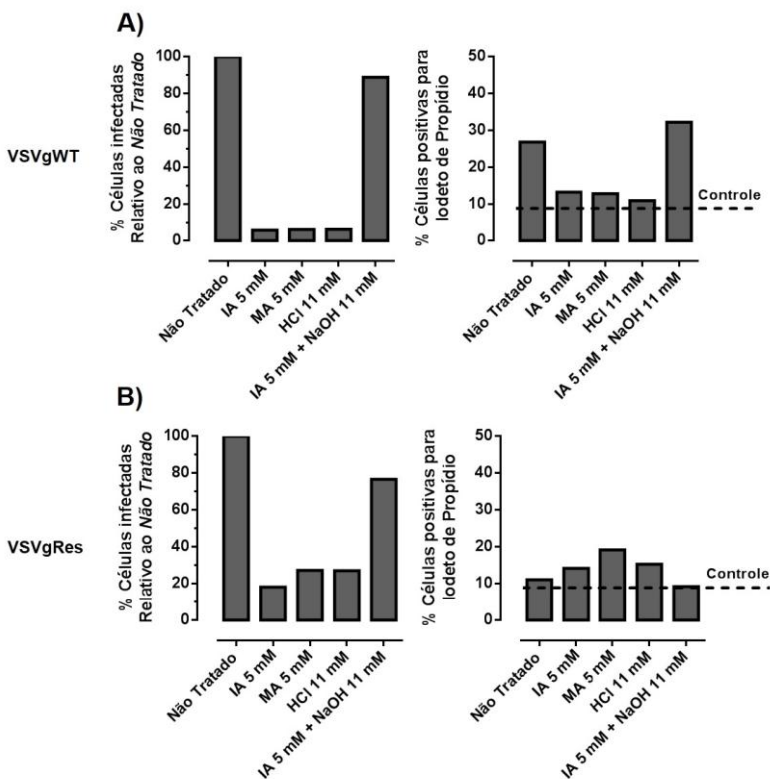


Figura 39. Células RAW264.7 infectadas por VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05. Tratamento com IA 5 mM, MA 5 mM, HCl 11 mM ou a mistura de IA 5 mM e NaOH 11 mM por 14 h. **(A)** Porcentagem de infecção por VSVgWT relativo ao grupo Não Tratado; e porcentagem de células não viáveis (marcadas por iodeto de propídio). **(B)** Porcentagem de infecção por VSVgRes relativo ao grupo Não Tratado; e porcentagem de células não viáveis (marcadas por iodeto de propídio). Controle: sem infecção e sem tratamento.

Os sobrenadantes das células infectadas foram coletadas e utilizadas para titulação do VSVgWT e VSVgRes com os diferentes tratamentos. Na **figura 40A**, o vírus VSVgWT sem tratamento obteve o título de 1×10^8 UFP/mL. Os tratamentos com IA, MA ou HCl reduziram cerca de 1 log dos títulos virais e o tratamento com IA + NaOH reduziu cerca de 0,5 log em comparação com o grupo sem tratamento. Na **Figura 40B**, observa-se que o vírus VSVgRes sem tratamento obteve o título de 1×10^5 UFP/mL. Os tratamentos com IA ou HCl reduziram cerca de 1 log dos títulos virais, o tratamento com MA reduziu cerca de 1,5 logs e nas células tratadas com IA e NaOH não foi observado diferença nos títulos virais em comparação com o grupo não tratado.

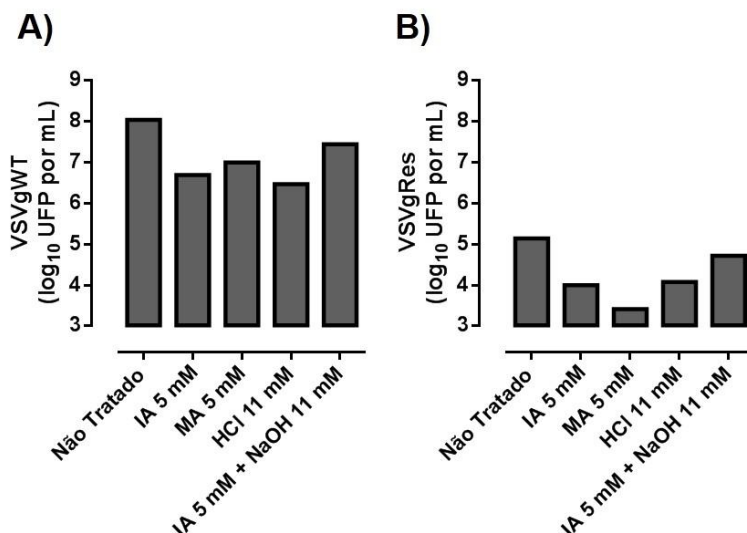


Figura 40. Titulação do sobrenadante de células RAW264.7 infectadas por VSVgWT ou VSVgRes em MOI de 0,05. Tratamento com 5 mM de IA, 5 mM MA, 11 mM de HCl ou 5 mM IA mais 11 mM de NaOH por 14 h. **(A)** Infecção por VSVgWT. **(B)** Infecção por VSVgRes.

Este conjunto de resultados confirma que o vírus VSVgRes não é resistente ao pH acidificado em células RAW264.7 e sugere-se que este vírus possui menor produção de partículas virais viáveis.

4.5. TRATAMENTO COM IA EM CÉLULAS INFECTADAS POR VACVEGFP

Para verificar se o IA possui atividade antiviral em outros vírus, células A549 foram infectadas pelo vírus VACVeGFP com MOI 0,5 (**Figura 41**). As células foram incubadas por 90 min, foram lavadas e incubadas novamente com 5 mM de IA (pH 6,99), 5 mM de MA (pH 6,98), ou 11,5 mM de HCl (pH 6,88) por 24 h. O grupo não tratado obteve cerca de 70 % de células infectadas e o tratamento com o IA, MA ou HCl reduziu para aproximadamente 60 %.

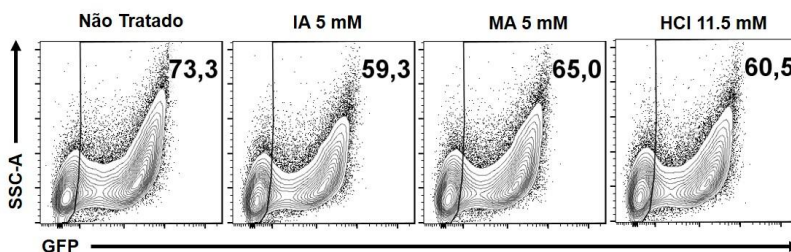


Figura 41. Células A549 infectadas por VACVeGFP em MOI de 0,5. Tratamento com 5 mM de IA, 5 mM de MA ou 11,5 mM de HCl por 24 h. Portentagem de células infectadas (GFP positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*.

O resultado demonstra que o vírus VACVeGFP é pouco sensível ao pH acidificado, porém, o efeito do IA observado neste modelo consiste em um mecanismo associado à diminuição do pH.

O resultado do experimento anterior foi expresso na forma de gráfico de barras e demonstra a porcentagem de células infectadas relativas ao grupo sem tratamento (**Figura 42A**). Os tratamentos com IA, MA ou HCl reduziram entre 10 e 20 % de infecção em comparação com o grupo sem tratamento. O sobrenadante das células infectadas foi coletado para quantificação viral por titulação, demonstrado na **Figura 42B**. Como controle, o sobrenadante das células não infectadas também foi titulado e não foi observado formação de UFP. Observa-se que todas as amostras, com ou sem tratamento, obtiveram títulos próximos a 5×10^6 UFP por mL.

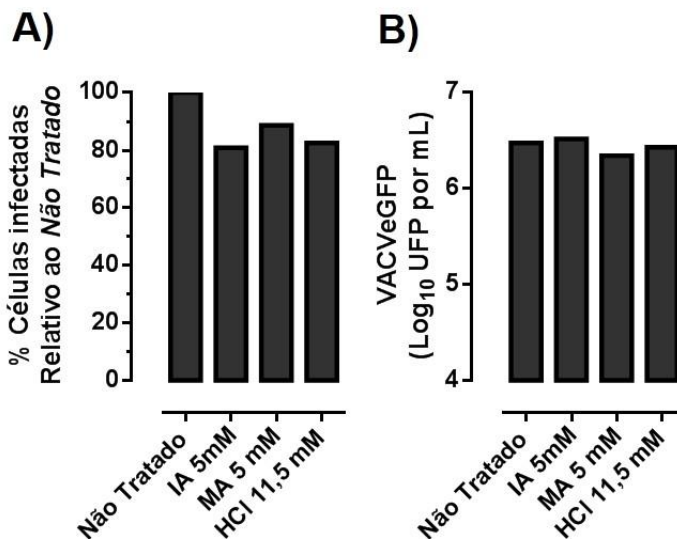


Figura 42. Células A549 infectadas por VACVeGFP em MOI de 0,5. Tratamento com 5 mM de IA, 5 mM de MA ou 11,5 mM de HCl por 24 h. (A) Portentagem de células infectadas por VACVeGFP (GFP positivo) relativo ao grupo Não Tratado. (B) Titulação do sobrenadante de células A549 infectadas por VACVeGFP sob os diferentes tratamentos.

Este conjunto de resultados demonstra que o IA ou MA não possuem atividade antiviral em VACVeGFP e este vírus é resistente ao pH acidificado pelos tratamentos.

4.6. TRATAMENTO COM IA EM CÉLULAS INFECTADAS POR *DENGUE VIRUS* (DENV) OU *ZIKA VIRUS* (ZIKV)

Através da colaboração com o Dr. Diogo Kuczera e com Dr. Juliano Bordignon (ICC, Curitiba), células A549 foram infectadas pelos vírus DENV (MOI 1) ou ZIKV (MOI 0,1) e tratadas com 5 mM de IA (pH 6,61) ou com HCl (pH 6,65) por 48 h. Para detecção dos vírus, foi utilizado o anticorpo contra *Flavivirus* (4G2) conjugado com FITC para aquisição por citometria de fluxo (**Figura 43A**). O resultado também foi expresso na forma de gráfico de barras e mostra a porcentagem de infecção relativa ao grupo sem tratamento (**Figura 43B**). Em relação à infecção pelo DENV, os tratamentos com IA ou HCl aumentaram cerca

de 20 % das células infectadas pelo DENV comparados com o controle não tratado. Entretanto, na infecção por ZIKV foi observado que o IA diminuiu cerca de 60 % de células infectadas comparado com o grupo sem tratamento e o controle de pH diminuiu cerca de 20 %.

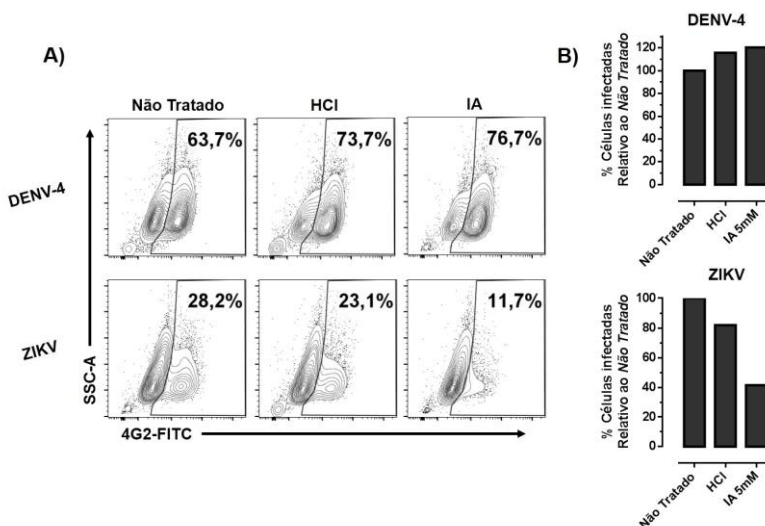


Figura 43. Células A549 infectadas por DENV em MOI de 1, ou ZIKV em MOI de 0,1. Tratamento com 5 mM IA por 48 h. Controle de pH com HCl. A) Portentagem de células infectadas (4G2 positivo) representada por gráficos do tipo *contour plot*. **B)** Portentagem de infecção relativo ao grupo Não Tratado.

Estes resultados sugerem o IA possui uma atividade antiviral, independente de pH, contra o vírus ZIKV. Com base nestes resultados, será necessária uma investigação para determinar este mecanismo antiviral alternativo do IA, com o objetivo de proporcionar novos alvos terapêuticos para o tratamento contra o ZIKV.

Com base nos resultados, foi gerado um desenho esquemático que resume a atividade antiviral do IA.

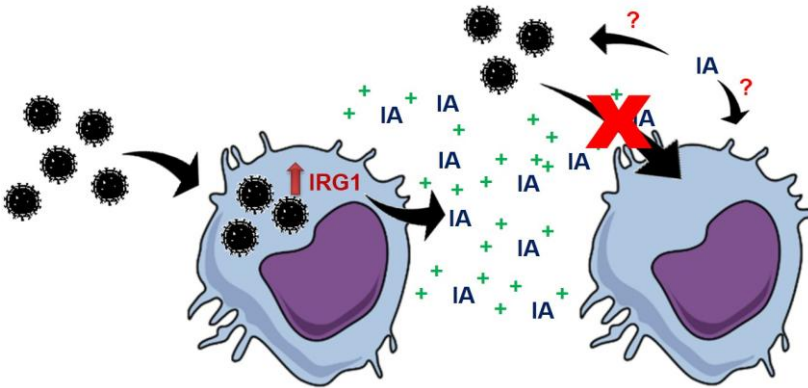


Figura 44. Desenho esquemático da atividade antiviral do IA. Macrófagos infectados por vírus aumentam a expressão de *Irg1* que catalisa a produção de IA. O IA produzido é liberado no meio extracelular, acidifica o microambiente e inibe a infecção do vírus nas células adjacentes. O IA possui um efeito independente à acidificação do pH.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi iniciado a geração de células RAW264.7 deficientes para o gene *Irg1* e a construção de um vetor de expressão para o gene *Irg1* para superexpressá-lo em células não produtoras de IA. A construção destas ferramentas estão em andamento. Neste trabalho também foram realizados experimentos através de tratamento exógeno com o IA em células de cultura infectadas por vírus, com o objetivo de analisar a sua atividade antiviral. Foi demonstrado que o IA possui um efeito inibitório na infecção por VSVeGFP associado com a diminuição do pH no meio extracelular. Não foi observado uma atividade antiviral nos vírus VACVeGFP e DENV. Entretanto, foi demonstrado que o IA possui atividade antiviral contra o vírus ZIKV, de forma independente à acidificação do pH.

Primeiramente tínhamos o objetivo de estudar a importância da produção endógena de IA na atividade antiviral através da enzima IRG1. Para isso, foi necessário realizar a criação de duas ferramentas de trabalho. A primeira foi gerar células RAW264.7 com produção de IRG1 deficiente. A segunda ferramenta foi superexpressar *Irg1* em células que não a expressam, como por exemplo, a célula A549 ou a célula RAW264.7 com o gene deficiente.

A região da sequência dos guias desenhados para a técnica de CRISPR/Cas9 apresenta um sítio ativo da enzima (MICHELUCCI *et al.*, 2013). Com isso, sugere-se que a edição desta região comprometerá a função da enzima, levando ao bloqueio na produção de IA. Os vetores contendo os guias foram construídos como esperado (**Figuras 09 ao 11**). No entanto, as células RAW264.7 foram transfectadas e dentre os clones selecionados não foram encontradas células deficientes para o gene *Irg1* (**Figuras 12 e 13**). Outras metodologias estão sendo analisadas para geração das células deficientes, uma delas é a transdução de lentivírus contendo o gene *Cas9*, para produção de células RAW264.7 que expressam esta enzima constitutivamente (SANJANA *et al.*, 2014). Desta maneira, pode-se adicionar os guias transcritos *in vitro* diretamente nas células, facilitando a edição do gene de interesse.

Para geração de células A549 que superexpressam *Irg1*, foram utilizados macrófagos imortalizados murinos como fonte da RNA mensageiro da enzima. Contudo, foi observado que dois nucleotídeos da sequência do *Irg1* presentes no vetor de clonagem estavam diferentes em comparação com a sequência descrita na literatura (**Figuras 14 ao**

19). Com isso, o protocolo foi reiniciado e a construção do vetor está em andamento.

O próximo objetivo foi estudar o impacto da administração exógena do IA em células de cultura infectadas por vírus. Inicialmente foram utilizadas células HEK293, como modelo de células que não expressam a enzima IRG1 e consequentemente não produzem IA (dados não mostrados). Estas células foram utilizadas inicialmente para testar a citotoxicidade do IA em diferentes concentrações. As concentrações foram selecionadas com base nos níveis normalmente encontrados no sobrenadante de células RAW264.7 estimuladas com LPS (cerca de 8 mM) (MICHELUCCI *et al.*, 2013) (**Figura 20**). Não foi observado alterações de viabilidade nas concentrações de IA utilizadas nestas células, com exceção do controle de 20 mM. Desta forma, foram utilizadas estas concentrações como tratamento de células infectadas pelo vírus VSVeGFP. A rápida replicação, alto rendimento, facilidade na manipulação genética e a presença de GFP no genoma do VSV foi o motivo pela escolha deste vírus como modelo viral para este trabalho (HASTIE *et al.*, 2013).

As células HEK293 foram infectadas pelo vírus VSVeGFP sob tratamento de diferentes concentrações de IA (**Figuras 21 e 22**). Pela redução na infecção e pela diminuição dos títulos virais, observou-se que o IA possui atividade antiviral em VSV. Foi observado que as células HEK293, apesar de serem células aderentes, elas se soltam da placa e morrem com facilidade, diferentemente das células A549, outra célula que não produz IA (MICHELUCCI *et al.*, 2013). Por ter obtido resultados similares às células HEK293, as células A549 foram utilizadas durante os experimentos seguintes.

A próxima etapa do trabalho foi padronizar a MOI de VSVeGFP que seria utilizada nos demais experimentos (**Figuras 23 e 24**). Para isso foi utilizada a concentração de IA padronizada no experimento anterior. Demonstrou-se que o IA reduz a infecção de VSVeGFP em variadas MOIs. Foi observado que o aumento da MOI diminui a eficiência na atividade antiviral do IA. Como o tratamento começa após o período de infecção (90 min), sugerimos que o IA não afeta o vírus quando o mesmo já está dentro da célula e também não afeta sua viabilidade fora da célula. Entretanto, o IA poderia estar inibindo o espalhamento viral, impedindo a entrada do vírus na célula adjacente. Lanz e Bradstreet (1976) demonstraram que o espalhamento viral de HSV (*Herpes simplex virus*) é inibido pela acidificação do meio de cultura, sem alterar a viabilidade das células no meio extracelular (LANCZ e BRADSTREET,

1976). Nós sugerimos que o mesmo fenômeno poderia estar ocorrendo com o VSV sob o tratamento com IA.

Para verificar a hipótese de que o IA bloqueia o espalhamento viral, células VERO (utilizadas para realizar as titulações do VSV) foram infectadas pelo VSVeGFP e incubadas com meio de maior viscosidade (**Figura 25**). Ao observar no microscópio de fluorescência, foi notado que o tratamento com IA impediu o espalhamento viral, pois as células positivas para GFP estavam isoladas umas das outras e não foi observada a formação de UFPs.

Em busca do mecanismo de inibição do espalhamento viral pelo IA, foi demonstrado que o vírus VSV do sorotipo *Indiana* (mesmo sorotipo do VSVeGFP) é sensível ao pH abaixo de 7,0 (MARTINEZ e WERTZ, 2005). Já tínhamos observado que o meio de cultura contendo o IA 5 mM apresenta uma coloração amarelada, o que indica a acidez no meio. Ao medir o pH do meio com o ácido itacônico (**Figura 26**), foi confirmado que o pH torna-se abaixo de 7,0 na concentração de 5 mM de IA. Também foi observado uma variação do pH entre os experimentos, sabe-se que o pH do meio de cultura aumenta na ausência de CO₂ e isso é uma limitação da mensuração exata do pH neste trabalho.

Em 2010, Libersou e colaboradores observaram, por microscopia eletrônica de transmissão, que a conformação da glicoproteína G do vírus VSV é alterada quando o pH está abaixo de 7,0, ficando em uma conformação pós-fusional, impedindo a liberação do material genético em nanopartículas utilizada no trabalho (LIBERSOU *et al.*, 2010). Com base nos resultados deste e dos outros artigos citados acima, sugeriu-se que o IA pode estar bloqueando a infecção de VSVeGFP nas células adjacentes através da alteração na conformação da glicoproteína G, causada pela acidificação do meio extracelular.

Com objetivo de testar o efeito da acidez no vírus VSVeGFP e de obter um controle do pH, foi padronizado uma concentração de HCl em que o pH se assemelha ao pH do IA 5 mM (dados não mostrados). A concentração padronizada de HCl foi utilizada nas células infectadas pelo vírus VSVeGFP (**Figuras 27 e 28**). Como observado nos resultados, todos os efeitos antivirais do IA são os mesmos observados quando o pH está acidificado pelo HCl. Ao adicionar o IA com NaOH ocorreu a elevação do pH para valores próximos ao meio sem tratamento e o IA perdeu seu efeito antiviral. Portanto, o pH acidificado é importante para atividade antiviral do IA.

Para analisar se o IA possui uma atividade antiviral independente de pH, foi criado um vírus VSVeGFP resistente ao pH 6,8, utilizando um protocolo adaptado de Martinez e Wertz (MARTINEZ e WERTZ, 2005). Para isso, células VERO foram infectadas pelo VSVeGFP em pH próximo à 6,8, ajustado com HCl. Dos 24 poços da placa utilizada, em apenas um houve expansão viral (**Figura 29**). No protocolo original eram necessárias cinco passagens do vírus antes de começar a seleção clonal. Porém, como uma das 24 replicatas apresentou um vírus resistente logo na primeira passagem, foi iniciada uma seleção clonal a partir da terceira passagem. Os vírus resistentes criados neste trabalho foram submetidos a pHs semelhantes ao descrito no trabalho de Martinez e Werts (2005), na qual, observou-se mutações pontuais na glicoproteína G do vírus. Entretanto, as mutações observadas no VSVeGFP resistente deste trabalho também ocorreram em regiões pontuais, mas em nucleotídeos diferentes ao mostrado no artigo (**Figuras 32 ao 34**).

O vírus resistente ao pH 6,8 foi chamado de VSVgRes e teve sua infectividade avaliada em células A549 e RAW264.7 utilizando o HCl como controle de pH (**Figuras 35 ao 40**). Foi observado que as mutações geradas no VSVgRes diminuíram o *fitness* viral, ou seja, em meio sem tratamento e com pH acima de 7,0, o vírus resistente teve menor taxa de infecção e liberação de partículas viáveis no sobrenadante quando comparadas com o vírus não resistente. Um detalhe observado neste experimento foi que as poucas células infectadas por VSVgWT, sob tratamento com IA ou com HCl, produziram maiores títulos virais que cerca de 20 % a mais de células infectadas pelo vírus VSVgRes sob os mesmos tratamentos (**Figura 37**). Estes resultados sugerem que o vírus VSVgRes pode ter sofrido mutações em outras proteínas importantes que o compõe, incluindo proteínas não-estruturais. De acordo com os parâmetros avaliados, pode-se sugerir que a velocidade de replicação do vírus VSVgRes está comprometida ou os vírus liberados pelas células infectadas possuem baixa viabilidade, levando a baixos títulos virais. Em células RAW264.7 (**Figuras 38 ao 40**), o vírus VSVgRes se mostrou ainda mais ineficiente na infecção em comparação com o VSVgWT, pois a porcentagem de infecção sob os tratamentos foi a mesma do controle e gerou menores títulos virais. Sugere-se que as mutações do vírus resistente aumentaram a efetividade na resposta antiviral do macrófago de linhagem utilizada neste trabalho.

Outra forma utilizada para avaliar se o IA possui atividade antiviral independente do pH, foi através de células infectadas por

outros tipos de vírus. O VACVeGFP foi utilizado para testar o efeito antiviral do IA (**Figuras 41 e 42**). Foi observado que o tratamento com IA ou HCl diminuiu a porcentagem de células infectadas, porém não foi observado diferença na titulação do vírus em nenhum dos tratamentos. Sugere-se que o vírus VACVeGFP é resistente ao pH e o IA não possui atividade antiviral neste vírus. Sabe-se que o IA está associado com o acúmulo de succinato em células ativadas pela inibição da enzima SDH e que a proteína HIF-1 α , estabilizada pelo succinato, estimula a produção de IL-1 β (CORDES *et al.*, 2016). O vírus VACV possui uma proteína chamada C16 que também estabiliza HIF-1 α e está associado com o aumento no metabolismo da glutamina (MAZZON *et al.*, 2014). O comprometimento destas vias metabólicas pelo VACV pode estar influenciando na atividade do IA.

É importante ressaltar que Cho e colaboradores (2013) demonstraram que células neuronais superexpressando *Irg1* diminuíram os títulos virais de alguns vírus e em outros não foi observada diferença (CHO *et al.*, 2013). Sugere-se que, se o IA possui outro efeito antiviral além da relação com pH, nem todos os tipos de vírus seriam afetados. Por este motivo, a atividade antiviral do IA também foi testada em células infectadas pelos vírus DENV e ZIKV (**Figura 43**). O tratamento com IA nas células infectadas por DENV demonstrou-se ineficiente. Contudo, para nossa surpresa, foi demonstrado redução na porcentagem de células infectadas por ZIKV quando tratadas com IA, em comparação com as células não tratadas e este efeito observado foi independente da acidificação do pH. Este resultado foi importante para a continuação da busca pelo mecanismo antiviral do IA, embora seja necessária a repetição deste experimento para confirmação dos resultados.

Como considerações finais deste trabalho, pode-se ressaltar que a atividade antiviral do IA através da regulação do pH pode ser um efeito fisiológico da célula, tendo em vista que a concentração de IA que foi utilizada é encontrada no sobrenadante de células ativadas. A descrição de vias alternativas de resposta celular contra infecções virais é importante para aumentar o conhecimento em relação à fisiologia das células e também para geração de novos alvos terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

O ácido itacônico possui atividade antiviral associado à acidificação do meio extracelular e parece apresentar um efeito secundário independente do pH.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A. C.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, v. 413, n. 6857, p. 732-8, 2001.

BASLER, T.; JECKSTADT, S.; VALENTIN-WEIGAND, P.; GOETHE, R. Mycobacterium paratuberculosis, Mycobacterium smegmatis, and lipopolysaccharide induce different transcriptional and post-transcriptional regulation of the IRG1 gene in murine macrophages. *J Leukoc Biol*, v. 79, n. 3, p. 628-38, 2006.

CHIU, Y. H.; MACMILLAN, J. B.; CHEN, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*, v. 138, n. 3, p. 576-91, 2009.

CHO, H.; PROLL, S. C.; SZRETTER, K. J.; KATZE, M. G.; GALE, M., JR.; DIAMOND, M. S. Differential innate immune response programs in neuronal subtypes determine susceptibility to infection in the brain by positive-stranded RNA viruses. *Nat Med*, v. 19, n. 4, p. 458-64, 2013.

CHO, Y. S.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; GENGA, R.; RAY, T. D.; GUILDFORD, M.; CHAN, F. K. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, v. 137, n. 6, p. 1112-23, 2009.

CORDES, T.; WALLACE, M.; MICHELUCCI, A.; DIVAKARUNI, A. S.; SAPCARIU, S. C.; SOUSA, C.; KOSEKI, H.; CABRALES, P.; MURPHY, A. N.; HILLER, K.; METALLO, C. M. Immunoresponsive Gene 1 and Itaconate Inhibit Succinate Dehydrogenase to Modulate Intracellular Succinate Levels. *J Biol Chem*, v. 291, n. 27, p. 14274-84, 2016.

DE WEERD, N. A.; VIVIAN, J. P.; NGUYEN, T. K.; MANGAN, N. E.; GOULD, J. A.; BRANIFF, S. J.; ZAKER-TABRIZI, L.; FUNG, K. Y.; FORSTER, S. C.; BEDDOE, T.; REID, H. H.;

ROSSJOHN, J.; HERTZOG, P. J. Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nat Immunol*, v. 14, n. 9, p. 901-7, 2013.

DEGRANDI, D.; HOFFMANN, R.; BEUTER-GUNIA, C.; PFEFFER, K. The proinflammatory cytokine-induced IRG1 protein associates with mitochondria. *J Interferon Cytokine Res*, v. 29, n. 1, p. 55-67, 2008.

DIEBOLD, S. S.; KAISHO, T.; HEMMI, H.; AKIRA, S.; REIS E SOUSA, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1529-31, 2004.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, v. 32, n. 5, p. 1792-7, 2004.

FERGUSON, B. J.; MANSUR, D. S.; PETERS, N. E.; REN, H.; SMITH, G. L. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife*, v. 1, p. e00047, 2012.

FITZGERALD, K. A.; MCWHIRTER, S. M.; FAIA, K. L.; ROWE, D. C.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D. T.; COYLE, A. J.; LIAO, S. M.; MANIATIS, T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, v. 4, n. 5, p. 491-6, 2003.

FREDERICKSEN, B. L.; WHITT, M. A. Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness. *Virology*, v. 240, n. 2, p. 349-58, 1998.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, v. 31, n. 13, p. 3784-8, 2003.

HASTIE, E.; CATALDI, M.; MARRIOTT, I.; GRDZELISHVILI, V. Z. Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res*, v. 176, n. 1-2, p. 16-32, 2013.

HEIL, F.; HEMMI, H.; HOCHREIN, H.; AMPENBERGER, F.; KIRSCHNING, C.; AKIRA, S.; LIPFORD, G.; WAGNER, H.; BAUER, S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1526-9, 2004.

HEMMI, H.; KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; SATO, S.; SANJO, H.; HOSHINO, K.; HORIUCHI, T.; TOMIZAWA, H.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, v. 3, n. 2, p. 196-200, 2002.

HOFFMANN, H. H.; SCHNEIDER, W. M.; RICE, C. M. Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol*, v. 36, n. 3, p. 124-38, 2015.

HONG, X. X.; CARMICHAEL, G. G. Innate immunity in pluripotent human cells: attenuated response to interferon-beta. *J Biol Chem*, v. 288, n. 22, p. 16196-205, 2013.

HOSHINO, K.; KAISHO, T.; IWABE, T.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol*, v. 14, n. 10, p. 1225-31, 2002.

HUSAIN, M.; MOSS, B. Vaccinia virus F13L protein with a conserved phospholipase catalytic motif induces colocalization of the B5R envelope glycoprotein in post-Golgi vesicles. *J Virol*, v. 75, n. 16, p. 7528-42, 2001.

ISHIKAWA, H.; BARBER, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, v. 455, n. 7213, p. 674-8, 2008.

ISHIKAWA, H.; MA, Z.; BARBER, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, v. 461, n. 7265, p. 788-92, 2009.

JHA, A. K.; HUANG, S. C.; SERGUSHICHEV, A.; LAMPROPOULOU, V.; IVANOVA, Y.; LOGINICHEVA, E.; CHMIELEWSKI, K.; STEWART, K. M.; ASHALL, J.; EVERTS, B.; PEARCE, E. J.; DRIGGERS, E. M.; ARTYOMOV, M. N. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, v. 42, n. 3, p. 419-30, 2015.

JIANG, X.; KINCH, L. N.; BRAUTIGAM, C. A.; CHEN, X.; DU, F.; GRISHIN, N. V.; CHEN, Z. J. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity*, v. 36, n. 6, p. 959-73, 2012.

KANAMASA, S.; DWIARTI, L.; OKABE, M.; PARK, E. Y. Cloning and functional characterization of the cis-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 80, n. 2, p. 223-9, 2008.

KANG, D. C.; GOPALKRISHNAN, R. V.; WU, Q.; JANKOWSKY, E.; PYLE, A. M.; FISHER, P. B. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 2, p. 637-42, 2002.

LAMKEN, P.; GAVUTIS, M.; PETERS, I.; VAN DER HEYDEN, J.; UZE, G.; PIEHLER, J. Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1. *J Mol Biol*, v. 350, n. 3, p. 476-88, 2005.

LANCZ, G. J.; BRADSTREET, J. J. pH mediated inhibition of the cell to cell spread of herpes simplex virus infection. *Arch Virol*, v. 52, n. 1-2, p. 37-46, 1976.

LAWSON, N. D.; STILLMAN, E. A.; WHITT, M. A.; ROSE, J. K. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 10, p. 4477-81, 1995.

LEE, C. G.; JENKINS, N. A.; GILBERT, D. J.; COPELAND, N. G.; O'BRIEN, W. E. Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics*, v. 41, n. 5, p. 263-70, 1995.

LI, H.; GANG, Z.; YULING, H.; LUOKUN, X.; JIE, X.; HAO, L.; LI, W.; CHUNSONG, H.; JUNYAN, L.; MINGSHEN, J.; YOUXIN, J.; FEILI, G.; BOQUAN, J.; JINQUAN, T. Different neurotropic pathogens elicit neurotoxic CCR9- or neurosupportive CXCR3-expressing microglia. *J Immunol*, v. 177, n. 6, p. 3644-56, 2006.

LIBERSOU, S.; ALBERTINI, A. A.; OULDALI, M.; MAURY, V.; MAHEU, C.; RAUX, H.; DE HAAS, F.; ROCHE, S.; GAUDIN, Y.; LEPAULT, J. Distinct structural rearrangements of the VSV glycoprotein drive membrane fusion. *J Cell Biol*, v. 191, n. 1, p. 199-210, 2010.

LOHKAMP, B.; BAUERLE, B.; RIEGER, P. G.; SCHNEIDER, G. Three-dimensional structure of iminodisuccinate epimerase defines the fold of the MmgE/PrpD protein family. *J Mol Biol*, v. 362, n. 3, p. 555-66, 2006.

LUND, J.; SATO, A.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R.; IWASAKI, A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, v. 198, n. 3, p. 513-20, 2003.

LUND, J. M.; ALEXOPOULOU, L.; SATO, A.; KAROW, M.; ADAMS, N. C.; GALE, N. W.; IWASAKI, A.; FLAVELL, R. A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 15, p. 5598-603, 2004.

MALAKHOVA, O. A.; KIM, K. I.; LUO, J. K.; ZOU, W.; KUMAR, K. G.; FUCHS, S. Y.; SHUAI, K.; ZHANG, D. E. UBP43 is a novel

regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *Embo j*, v. 25, n. 11, p. 2358-67, 2006.

MANSUR, D. S.; SMITH, G. L.; FERGUSON, B. J. Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system. *Microbes Infect*, v. 16, n. 12, p. 1002-12, 2014.

MARTINEZ, I.; WERTZ, G. W. Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity. *J Virol*, v. 79, n. 6, p. 3578-85, 2005.

MAZZON, M.; CASTRO, C.; ROBERTS, L. D.; GRIFFIN, J. L.; SMITH, G. L. A role for vaccinia virus protein C16 in reprogramming cellular energy metabolism. *J Gen Virol*, v. 96, n. Pt 2, p. 395-407, 2014.

MCNAB, F.; MAYER-BARBER, K.; SHER, A.; WACK, A.; O'GARRA, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol*, v. 15, n. 2, p. 87-103, 2015.

MICHELUCCI, A.; CORDES, T.; GHELFI, J.; PAILOT, A.; REILING, N.; GOLDMANN, O.; BINZ, T.; WEGNER, A.; TALLAM, A.; RAUSELL, A.; BUTTINI, M.; LINSTER, C. L.; MEDINA, E.; BALLING, R.; HILLER, K. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 19, p. 7820-5, 2013.

MIYOSHI, K.; CUI, Y.; RIEDLINGER, G.; ROBINSON, P.; LEHOCZKY, J.; ZON, L.; OKA, T.; DEWAR, K.; HENNIGHAUSEN, L. Structure of the mouse Stat 3/5 locus: evolution from Drosophila to zebrafish to mouse. *Genomics*, v. 71, n. 2, p. 150-5, 2001.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; JANEWAY, C. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science, 2012.

NAUJOKS, J.; TABELING, C.; DILL, B. D.; HOFFMANN, C.; BROWN, A. S.; KUNZE, M.; KEMPA, S.; PETER, A.; MOLLENKOPF, H. J.; DORHOI, A.; KERSHAW, O.; GRUBER, A. D.; SANDER, L. E.; WITZENRATH, M.; HEROLD, S.; NERLICH, A.; HOCKE, A. C.; VAN DRIEL, I.; SUTTORP, N.; BEDOUL, S.; HILBI, H.; TROST, M.; OPITZ, B. IFNs Modify the Proteome of Legionella-Containing Vacuoles and Restrict Infection Via IRG1-Derived Itaconic Acid. *PLoS Pathog*, v. 12, n. 2, p. e1005408, 2016.

O'NEILL, L. A. A critical role for citrate metabolism in LPS signalling. *Biochem J*, v. 438, n. 3, p. e5-6, 2011.

O'NEILL, L. A.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 6, p. 453-60, 2013.

O'NEILL, L. A.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*, v. 16, n. 9, p. 553-65, 2016.

PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; CURTIS, A. M.; GOEL, G.; LAUTERBACH, M. A.; SHEEDY, F. J.; GLEESON, L. E.; VAN DEN BOSCH, M. W.; QUINN, S. R.; DOMINGO-FERNANDEZ, R.; JOHNSTON, D. G.; JIANG, J. K.; ISRAELEN, W. J.; KEANE, J.; THOMAS, C.; CLISH, C.; VANDER HEIDEN, M.; XAVIER, R. J.; O'NEILL, L. A. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1alpha activity and IL-1beta induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*, v. 21, n. 1, p. 65-80, 2015.

PREUSSE, M.; TANTAWY, M. A.; KLAWONN, F.; SCHUGHART, K.; PESSLER, F. Infection- and procedure-dependent effects on pulmonary gene expression in the early phase of influenza A virus infection in mice. *BMC Microbiol*, v. 13, p. 293, 2013.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; WRIGHT, J.; AGARWALA, V.; SCOTT, D. A.; ZHANG, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, v. 8, n. 11, p. 2281-308, 2013.

SAKAI, A.; KUSUMOTO, A.; KISO, Y.; FURUYA, E. Itaconate reduces visceral fat by inhibiting fructose 2,6-bisphosphate synthesis in rat liver. *Nutrition*, v. 20, n. 11-12, p. 997-1002, 2004.

SANJANA, N. E.; SHALEM, O.; ZHANG, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. United States, p. 783-4, 2014.

SATOH, T.; KATO, H.; KUMAGAI, Y.; YONEYAMA, M.; SATO, S.; MATSUSHITA, K.; TSUJIMURA, T.; FUJITA, T.; AKIRA, S.; TAKEUCHI, O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 4, p. 1512-7, 2010.

SCHNEIDER, W. M.; CHEVILLOTTE, M. D.; RICE, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*, v. 32, p. 513-45, 2014.

SCHOGGINS, J. W.; WILSON, S. J.; PANIS, M.; MURPHY, M. Y.; JONES, C. T.; BIENIASZ, P.; RICE, C. M. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, v. 472, n. 7344, p. 481-5, 2011.

SHI, S.; BLUMENTHAL, A.; HICKEY, C. M.; GANDOTRA, S.; LEVY, D.; EHRT, S. Expression of many immunologically important genes in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages is independent of both TLR2 and TLR4 but dependent on IFN- α receptor and STAT1. *J Immunol*, v. 175, n. 5, p. 3318-28, 2005.

SIEGAL, F. P.; KADOWAKI, N.; SHODELL, M.; FITZGERALD-BOCARSLY, P. A.; SHAH, K.; HO, S.; ANTONENKO, S.; LIU, Y. J. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, v. 284, n. 5421, p. 1835-7, 1999.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, v. 7, p. 539, 2011.

SUGIMOTO, M.; SAKAGAMI, H.; YOKOTE, Y.; ONUMA, H.; KANEKO, M.; MORI, M.; SAKAGUCHI, Y.; SOGA, T.; TOMITA, M. Non-targeted metabolite profiling in activated macrophage secretion. *Metabolomics*, v. 8, n. 4, p. 624-633, 2011.

SUN, L.; WU, J.; DU, F.; CHEN, X.; CHEN, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, v. 339, n. 6121, p. 786-91, 2012.

TAKAOKA, A.; WANG, Z.; CHOI, M. K.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; BAN, T.; LU, Y.; MIYAGISHI, M.; KODAMA, T.; HONDA, K.; OHBA, Y.; TANIGUCHI, T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, v. 448, n. 7152, p. 501-5, 2007.

TANAKA, Y.; CHEN, Z. J. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal*, v. 5, n. 214, p. ra20, 2012.

TANNAHILL, G. M.; CURTIS, A. M.; ADAMIK, J.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; MCGETTRICK, A. F.; GOEL, G.; FREZZA, C.; BERNARD, N. J.; KELLY, B.; FOLEY, N. H.; ZHENG, L.; GARDET, A.; TONG, Z.; JANY, S. S.; CORR, S. C.; HANEKLAUS, M.; CAFFREY, B. E.; PIERCE, K.; WALMSLEY, S.; BEASLEY, F. C.; CUMMINS, E.; NIZET, V.; WHYTE, M.; TAYLOR, C. T.; LIN, H.; MASTERS, S. L.; GOTTLIEB, E.; KELLY, V. P.; CLISH, C.; AURON, P. E.; XAVIER, R. J.; O'NEILL, L. A. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*, v. 496, n. 7444, p. 238-42, 2013.

TEIJARO, J. R. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr Opin Virol*, v. 16, p. 31-40, 2016.

UPTON, J. W.; KAISER, W. J.; MOCARSKI, E. S. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. *Cell Host Microbe*, v. 11, n. 3, p. 290-7, 2012.

WILMES, S.; BEUTEL, O.; LI, Z.; FRANCOIS-NEWTON, V.; RICHTER, C. P.; JANNING, D.; KROLL, C.; HANHART, P.; HOTTE, K.; YOU, C.; UZE, G.; PELLEGRINI, S.; PIEHLER, J. Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *J Cell Biol*, v. 209, n. 4, p. 579-93, 2015.

WU, D.; SANIN, D. E.; EVERTS, B.; CHEN, Q.; QIU, J.; BUCK, M. D.; PATTERSON, A.; SMITH, A. M.; CHANG, C. H.; LIU, Z.; ARTYOMOV, M. N.; PEARCE, E. L.; CELLA, M.; PEARCE, E. J. Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function. *Immunity*, v. 44, n. 6, p. 1325-36, 2016.

WU, J.; CHEN, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol*, v. 32, p. 461-88, 2014.

XIAO, W.; WANG, L.; XIAO, R.; WU, M.; TAN, J.; HE, Y. Expression profile of human immune-responsive gene 1 and generation and characterization of polyclonal antiserum. *Mol Cell Biochem*, v. 353, n. 1-2, p. 177-87, 2011.

YONEYAMA, M.; KIKUCHI, M.; NATSUKAWA, T.; SHINOBU, N.; IMAIZUMI, T.; MIYAGISHI, M.; TAIRA, K.; AKIRA, S.; FUJITA, T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, v. 5, n. 7, p. 730-7, 2004.

ANEXO

Tabela 9. Sequências de iniciadores utilizados no trabalho.

Nomes	Sequências
VSIV-1/5 Fwd	5'- CTCTCCTAATTCAGCCTCTCG -3'
VSIV-2/5 Fwd	5'- TCCGATCCTTCACCTCCATCTGT -3'
VSIV-3/5 Fwd	5'- GAGTCAGACTCCCATCAGGT -3'
VSIV-4/5 Fwd	5'- CCCAATGGAGTTCATGAGGACC -3'
VSIV-5/5 Fwd	5'- CAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGG -3'
GFP Rev	5'- GCACCACCGGCAAGCTG -3'
M13 Rev	5'- GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA -3'
T7 Fwd	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
IRG1-G1 Fwd	5'- CACCGACCTGTCCTCACAGCTCATTCGG -3'
IRG1-G1 Rev	5'- AAACCCGATAGAGCTGTGAGGACAGGTC -3'
IRG1-G2 Fwd	5'- GGACGGTGGGTGGGAAGACCCCGGCCAC -3'
IRG1-G2 Rev	5'- CCGGGGTCTTCCCACCCACCGTCCCAAA -3'
CAG Rev	5'-TGACTAATACGTAGATGTACTGCCAA -3'
pBR322 Fwd	5'- TCGCCACCTCTGACTTGA -3'
mIRG1(qPCR) Fwd	5'- GATTTTGTATGACACATGGCAC -3'
mIRG1(qPCR) Rev	5'- GTCGAGGCCAGAAACTT -3'
mGAPDH Fwd	5'- CGACTTCAACAGCAACTCCCACTC -3'
mGAPDH Rev	5'- CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC -3'
mIRG1(NheI) Fwd	5'- GCTAGCATGATGCTCAAGTCTGTCAC -3'
mIRG1(NotI) Rev	5'- GCGGCCGCTTAGATATTGGTAAACCTGGGC -3'
mIRG1(3/5) Fwd	5'- TCGGTGCCTTCTATGCCAAC -3'
mIRG1(4/5) Fwd	5'- CCACAGCCAGCAGGTCAATA -3'
mIRG1(Mut1) Fwd	5'-CTGTCCCATCCTTCCACAGCCAG-3'
mIRG1(Mut1) Rev	5'-CTGGCTGTGGAAGGATGGGACAG-3'
mIRG1(Mut2) Fwd	5'-CACTGAGCCAGGAAGATCTGCGCAAC-3'
mIRG1(Mut2) Rev	5'-GTTGCGCAGATCTTCCTGGCTCAGTG-3'